

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Alžběta Krupičková

Sekreční systém typu II v mitochondriích *Naegleria gruberi*
Type II secretion system in the mitochondria of *Naegleria gruberi*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 8. 2016

.....

Především bych na tomto místě ráda poděkovala svému školiteli Pavlu Doležalovi za poskytnuté rady, vědecké vedení, nadšení a humor. Děkuji Lubošovi a Vlad'ce za veškerou ochotu a pomoc. Děkuji Markétě za provázení v laboratorních začátcích. Děkuji Lence za spolupráci na T2SS, Vojtovi za nalezení genů a všem, kteří se pro toto téma nadchli. Děkuji všem kolegům z naší laboratoře za příjemné pracovní prostředí. Díky rodině a všem svým blízkým za podporu a pomoc, kterou jsem u nich vždy našla.

Abstrakt

V membránách gramnegativních bakterií se nachází několik typů transportních (sekrečních) systémů, které exportují proteiny do vnějšího prostředí bakterie. Mezi takové sekreční systémy patří i sekreční systém typu II (T2SS), který transportuje sbalené proteiny přes vnější membránu. Klíčové podjednotky T2SS byly objeveny v genomech některých prvoků patřících do skupiny Discoba a Malawimonada, včetně druhů *Naegleria gruberi* a *Malawimonas sp.* str. 249. Naše experimenty ukazují, že jsou tyto podjednotky lokalizovány v mitochondrii těchto prvoků. Objev těchto genů u eukaryot je překvapivý, a pokud by v mitochondriích těchto protist fungoval T2SS jako exportní sekreční systém, jednalo by se o mitochondrii na evolučním mezistupni, která je schopna jak proteiny importovat tak exportovat. V experimentální části této práce jsme studovali, jestli a jak spolu proteiny *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 interagují. Prokázali jsme četné interakce mezi proteiny, které odpovídají bakteriálnímu uspořádání T2SS. K tomu jsme využili metod kvasinkového dvouhybridního systému a bakteriálního dvouhybridního systému. Dále jsme zkoumali import klíčové podjednotky T2SS, pseudopilinu, *N. gruberi* do vnitřní membrány mitochondrií a import sekretinu *M. sp.* str. 249 do vnější membrány mitochondrií.

Abstract

Several types of the transport (secretion) systems can be found in the membranes of gram-negative bacteria. These systems export proteins into the extracellular milieu of bacteria. One of them, type II secretion system (T2SS), exports the folded proteins through the outer bacterial membrane. The core subunits of T2SS were discovered in the genomes of several protists belonging to the Discoba and Malawimonada groups, including *Naegleria gruberi* and *Malawimonas sp. str. 249*. Our experiments suggest that these subunits are localized in the mitochondria of these protists. The discovery of these genes in eukaryotes is surprising. If the T2SS was active in these mitochondria, it would represent an evolutionary intermediate stage of the organelle, which can export and import the proteins. In experimental part of the thesis, we studied how the proteins of *N. gruberi* and *M. sp. str. 249* interact. We demonstrated several interactions, which correspond to the function of bacterial T2SS. To this aim, we employed bacterial and yeast two-hybrid systems. Further, we explored the import of the core subunit of T2SS, pseudopilin, of *N. gruberi* into the inner mitochondrial membrane. And we also investigated the import of *M. sp. str. 249* secretin into the outer mitochondrial membrane.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Literární přehled | 2 |
| 2.1. Sekreční systémy u gramnegativních bakterií | 2 |
| 2.2. Sec a Tat dráha | 3 |
| 2.3. T2SS | 4 |
| 2.4. Složení a skládání T2SS | 6 |
| 2.4.1. Komplex vnější membrány | 6 |
| 2.4.2. Komplex vnitřní membrány | 8 |
| 2.4.3. Sekreční ATPáza | 9 |
| 2.4.4. Pseudopilus | 9 |
| 2.5. Mechanismus sekrece T2SS | 11 |
| 2.6. Import proteinů do mitochondrií | 13 |
| 2.7. Velké mitochondriální genomy u skupiny Jakobida | 15 |
| 2.8. T2SS v mitochondriích některých prvoků | 16 |
| 3. Cíle | 17 |
| 4. Materiál a metodika | 18 |
| 4.1. Organismy a jejich kultivace | 18 |
| 4.1.1. <i>Naegleria gruberi</i> | 18 |
| 4.1.2. <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| 4.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 19 |
| 4.2. Plazmidy | 20 |
| 4.3. Amplifikace genů | 21 |
| 4.4. Izolace a klonování DNA fragmentů | 24 |
| 4.5. Transformace bakterií | 25 |
| 4.6. Import proteinu do mitochondrií | 25 |
| 4.6.1. <i>In vitro</i> translace | 25 |
| 4.6.2. Izolace mitochondrií <i>N. gruberi</i> | 26 |
| 4.6.3. Izolace kvasinkových mitochondrií | 26 |
| 4.6.4. Import proteinu do mitochondrií | 28 |
| 4.6.5. SDS-PAGE | 30 |
| 4.6.6. Vysušení gelu, založení, vyvolání | 30 |

| | |
|---|----|
| 4.7. Bakteriální dvouhybridní systém..... | 31 |
| 4.7.1. Zaklonování genů do vektorů..... | 32 |
| 4.7.2. Příprava kompetentních bakterií..... | 32 |
| 4.7.3. Kotransformace bakterií | 33 |
| 4.7.4. Měření β -galaktosidázy (výpočet Millerových jednotek) | 33 |
| 4.8. Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H)..... | 34 |
| 4.8.1. Kotransformace kvasinek | 34 |
| 4.8.2. Rozkapání (Serial dilution test) | 35 |
| 4.9. Fluorescenční značení <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| 4.9.1. Transformace buněk <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| 4.9.2. Fluorescenční značení buněk <i>S. cerevisiae</i> | 37 |
| 5. Výsledky..... | 38 |
| 5.1. Bioinformatická analýza Gsp | 38 |
| 5.1.1. Alignmenty Gsp proteinů | 39 |
| 5.1.2. Analýza GspG..... | 44 |
| 5.1.3. Mitochondriální presekvence Gsp proteinů..... | 46 |
| 5.2. <i>Naegleria gruberi</i> | 46 |
| 5.2.1. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí Y2H | 46 |
| 5.2.2. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí BACTH | 47 |
| 5.2.3. Import NgGspG do mitochondrií..... | 48 |
| 5.3. <i>Malawimonas sp.</i> str. 249 | 51 |
| 5.3.1. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí Y2H | 51 |
| 5.3.2. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí BACTH | 54 |
| 5.3.3. Lokalizace M249GspD | 57 |
| 6. Diskuze | 58 |
| 6.1. Podjednotky T2SS u <i>N. gruberi</i> | 58 |
| 6.2. Podjednotky T2SS u <i>M. sp.</i> str. 249 | 60 |
| 6.3. T2SS v mitochondriích..... | 63 |
| 7. Závěr..... | 64 |
| 8. Seznam často používaných zkratk | 65 |
| 9. Seznam použité literatury | 66 |

1. Úvod

Mitochondrie je organela endosymbiotického původu vzniklá z α -proteobakterie. Ze své bakteriální minulosti si toho současná mitochondrie už mnoho neponechala. Většina mitochondrií si ve svém genomu zachovala pouze několik genů, které nebyly ani eliminovány ani přeneseny do jádra.

Je překvapivé, že v genomech některých eukaryotických organismů patřících do skupiny Discoba a u rodu *Malawimonas*, jehož fylogenetické postavení je stále předmětem diskuze, byly nalezeny klíčové podjednotky sekrečního systému typu II (T2SS). Konkrétně se jedná o parazitický druh *Naegleria fowleri*, který u lidí způsobuje primární amébovou meningoencefalitidu (PAM), onemocnění postihující mozek s vysokou smrtností. Dále se jedná o jejího neparazitického příbuzného *Naegleria gruberi*, dále o *Neovahlkampfia damariscottae*, *Reclinomonas americana*, *Andalucia godoyi*, *Malawimonas jakobiformis* a *Malawimonas sp.* str. 249.

T2SS se vyskytuje u gramnegativních bakterií a přenáší složené proteiny přes vnější membránu. Sestává se ze čtyř hlavních složek: komplexu vnější membrány tvořící sekretinový pór, pseudopilu, komplexu vnitřní membrány a sekreční ATPázy. Pokud by T2SS měl v mitochondriích těchto eukaryot stejnou funkci jako v bakteriích, jednalo by se o první známý transport proteinů směrem z mitochondrie a bylo by zajímavé studovat jeho mechanismus a proteiny, které by exportoval. Podrobnější ko-evoluční analýzou byl zatím pouze navržen potenciální substrát pro mitochondriální T2SS.

Literární rešerše je zaměřena na charakterizaci bakteriálního T2SS, popis struktury a funkce jednotlivých podjednotek a mechanismu sekrece. Také jsou stručně popsány bakteriální dráhy, které s ním spolupracují (Sec a Tat) a mitochondriální komplexy zodpovědné za import proteinů. Nakonec jsou krátce představeni eukaryotičtí zástupci, u kterých byl T2SS nalezen. Experimentální část je zaměřena na klíčové podjednotky T2SS u *Naegleria gruberi* a *Malawimonas sp.* str. 249, především na jejich interakce a na import hlavní komponenty pseudopilu GspG do mitochondrie.

2.2. Sec a Tat dráha

Některé sekreční systémy (např.: T2SS, T5SS) transportují proteiny pouze přes vnější membránu. Pro transport přes vnitřní membránu proto využívají dráhy Sec nebo Tat (Voulhox et al., 2001).

Sec dráha přenáší nesložené nebo nascentní polypeptidy přes membránu nebo je přímo do membrány vkládá. Vyskytuje se u prokaryot i eukaryot (v tomto případě se jedná o membránu endoplazmatického retikula). Transportované proteiny mají N-terminální signální peptid, který je rozpoznáván ribonukleoproteinem SRP (signal recognition particle) nebo SecB chaperonem a naváděn na translokázový kanál. SRP se váže na signální peptid a kotranslačně odvádí vznikající protein i s ribozomem na membránový receptor FtsZ. SecB se váže na signální peptid a kotranslačně nebo posttranslačně odvádí protein na podjednotku SecA (Papanikou et al., 2007). Membránový kanál se sestává ze tří podjednotek: SecY, SecE, SecG (Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ), z nichž nejvýznamnější je SecY, který vytváří samotný membránový kanál (van den Berg et al., 2003). Transport je poháněn ATPázou SecA a protonmotivní silou (Schiebel et al., 1991). Po uvolnění nesloženého proteinu štěpí signální peptidáza signální sekvenci a protein je sbalen do své nativní konformace (Paetzel et al., 2000).

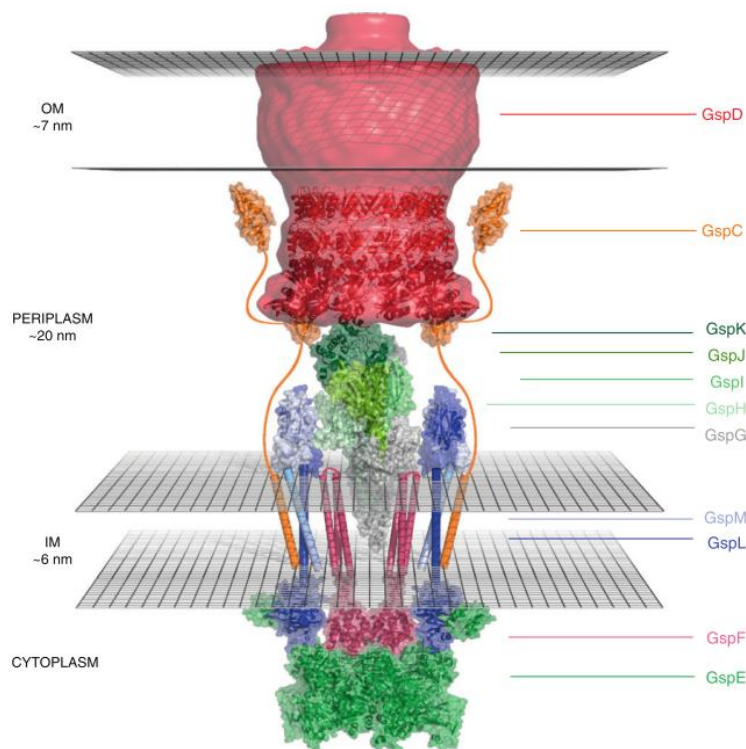
Naproti tomu Tat (twin-arginine translocation) dráha umožňuje díky svému unikátnímu mechanismu transport složených proteinů. Ty jsou mnohem objemnější než nesložené polypeptidy a navíc jsou rozměry jednotlivých přenášných substrátů velmi různorodé. Tat dráha se nachází ve většině bakterií, některých archaeí, chloroplastech a některých mitochondriích. U naprosté většiny živočichů a hub však tato dráha chybí. Substráty mají N-terminální signální peptid, ve kterém se nacházejí dva sousední argininy, od kterých je odvozen název dráhy. Tat dráha je složena z proteinových komplexů obsahujících membránové proteiny pouze z dvou proteinových rodin: TatA obsahující jeden transmembránový helix a TatC obsahující šest transmembránových helixů. Dalším proteinem patřícím do proteinové rodiny TatA je TatB (Berks, 2015). Nejdříve je rozpoznán Nterminální signální peptid substrátu, který se váže na membránový komplex TatB/C (Cline and Mori, 2001). Poté co je substrát rozpoznán se spouští oligomerizace TatA za přítomnosti protonmotivní síly (Mori and Cline, 2002). Oligomer TatA obklopující přenášený protein pak zřejmě zprostředkovává i vlastní transport přes membránu. Signální peptidáza poté štěpí signální peptid (Lüke et al., 2009) a TatA se uvolňuje z komplexu TatA/B/C (Mori and Cline, 2002).

2.3. T2SS

Přestože T2SS překlenuje svými podjednotkami vnitřní i vnější membránu je schopen transportu substrátů pouze přes vnější membránu. V této práci je užíváno označení jednotlivých proteinů T2SS jako general secretory pathway (Gsp) následované velkým písmenem, ale tato nomenklatura není bezvýhradně přijímána. T2SS komponenty u *Vibrio cholerae* se označují Eps (extracellular protein secretion), u *Klebsiella oxytoca* jako Pul (pullulanase secretion) nebo u *Pseudomonas aeruginosa* jako Xcp.

T2SS byl objeven d'Enfert et al. (1987), když *Escherichia coli*, transformovaná genem pullulanázy (lipoprotein štěpící větvcí se škroby) spolu se sekrečními geny *Klebsiella pneumoniae*, začala pullulanázu sekretovat. Bylo také zjištěno, že gen pro pullulanázu byl součástí operonu pro sekreční systém.

Tento sekreční systém se skládá ze čtyř hlavních částí: komplexu vnější membrány, pseudopilu, komplexu vnitřní membrány a sekreční ATPázy (Obr. 2, Tab. 1). Do T2SS patří ještě proteiny GspB, GspH a GspN, které se však nevyskytují u všech T2SS a nejsou esenciální pro jeho funkci (Possot et al., 2000).



Obrázek 2: Molekulární model T2SS: hexamer GspE (zeleně), dimer GspF (růžově), dva heterodimery GspL (tmavě modře) - GspM (světle modře), minoritní pseudopiliny: GspK (tmavě zeleně), GspJ, GspI, GspH (světle zeleně), čtyři monomery hlavního pseudopilinu GspG (šedě), dodekamer GspD s vyznačenými N doménami (červeně), GspC (oranžově). Převzato z (McLaughlin et al., 2012).

Tabulka 1: Přehled hlavních podjednotek T2SS.

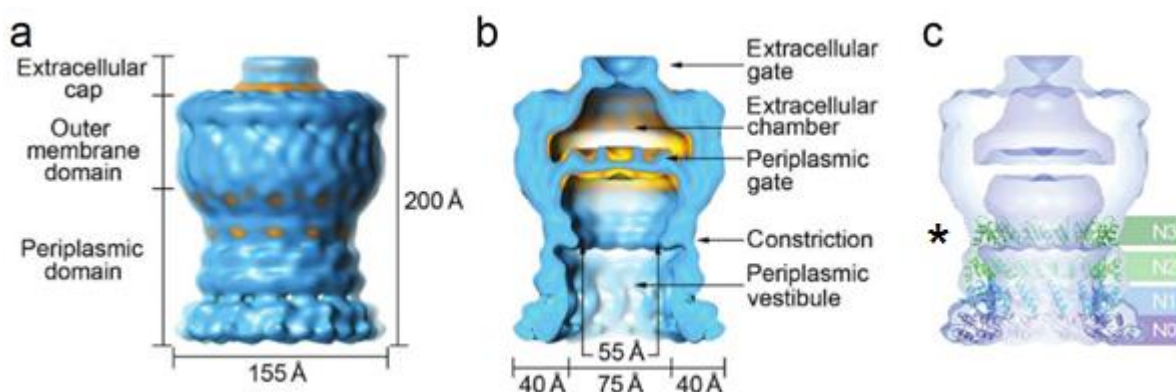
| | | |
|---------------------------------|------|---|
| Komplex vnější membrány | GspD | tvoří pór ve vnější membráně |
| | GspS | lipoprotein pilotin, periplazmatický chaperon navádějící GspD do vnější membrány |
| Komplex vnitřní membrány | GspM | interaguje s GspL |
| | GspF | polytopický transmembránový protein, interaguje s GspL |
| | GspL | interaguje s GspE, GspM a GspF |
| | GspC | periplazmatická spojka vnitřní a vnější membrány |
| Sekreční ATPáza | GspE | dodává energii pro T2SS hydrolýzou ATP |
| Pseudopilus | GspG | hlavní pseudopilin, podjednotky GspG tvoří pseudopilus |
| | GspI | iniciuje skládání pseudopilu |
| | GspJ | umožňuje vazbu GspH na ostatní minoritní pseudopiliny |
| | GspK | na špičce pseudopilu, řídí délku pseudopilu |
| | GspH | spojka mezi špičkou pseudopilu z minoritních pseudopilinů a vlastním pseudopilem z GspG podjednotek |

Srovnávací analýzy ukázaly, že T2SS má zřejmě společný původ s pilusovým systémem typu IV (T4PS), systémem syntézy archeálního bičíku a bakteriálním transformačním systémem. Všechny tyto systémy obsahují cytoplazmatickou ATPázu; komplex vnitřní membrány s proteiny obsahujícími transmembránové α -helixy; pilin, pseudopilin nebo flagelin a specifickou membránovou proteázu. Komplex vnější membrány se nachází pouze u T4PS, protože archaea ani grampozitivní bakterie vnější membránu nemají. T4PS i T2SS mají sekretinový pór ve vnější membráně a jsou si zřejmě evolučně nejpříbuznější. (Korotkov et al., 2012).

2.4. Složení a skládání T2SS

2.4.1. Komplex vnější membrány

Komplex vnější membrány se skládá především z vlastního póru, patřícího do třídy sekretinů, GspD. Ten je tvořen 12 podjednotkami (Nouwen et al., 1999). Nedávná studie u *Pseudomonas aeruginosa* (Van der Meeren et al., 2013) navrhla trochu odlišné uspořádání póru, který by měl být tvořen hexamerem sekretinových dimerů. Obecně sekretiny tvoří multidoménové kanály ve vnější membráně s velmi konzervovanou sekretinovou doménou na C-terminálním konci (Genin and Boucher, 1994). C-terminální doméně předcházejí tři vysoce homologní N-domény (N3, N2, N1) a N0 doména. N-domény jsou mezi sebou spojeny pohyblivými smyčkami (Korotkov et al., 2010). Reichow et al. (2010) popsali velmi dobře strukturu sekretinu u *Vibrio cholerae* za použití elektronové kryomikroskopie (Obr. 3). Tento kanál má průměr 155 Å a je 200 Å dlouhý. Má periplazmatickou doménu, na kterou navazuje doména vnější membrány. Na úplném vrchu je pak extracelulární doména. V periplazmatické doméně je periplazmatický vestibul s konstričním místem tvořeným N3 doménou, která může iniciovat konformační změny během sekrece proteinu. Periplazmatický vestibul je oddělen periplazmatickou bránou od extracelulární dutiny, která je na druhém konci uzavřena extracelulární bránou.



Obrázek 3: Struktura GspD u *Vibrio cholerae* (VcGspD). (a) Postranní pohled rekonstrukce VcGspD v rozlišení 19 Å. Identifikovány tři domény: periplazmatická doména, doména vnější membrány a extracelulární konec. (b) Pohled do podélně rozříznutého kanálu odhaluje periplazmatický vestibul s konstričním místem, periplazmatickou bránu, extracelulární dutinu a extracelulární bránu. Extracelulární dutina je ~ 100 Å široká, zatímco periplazmatický vestibul má pouze ~ 75 Å v průměru. Periplazmatické konstriční místo zužuje periplazmatický vestibul na ~ 55 Å, zatímco extracelulární brána se otvírá pouze na 10 Å. (c) Konstriční místo periplazmatické domény je tvořeno N3 doménou. Převzato z (Reichow et al., 2010).

Sekretiny se vyskytují ve vnější membráně i jako součást několika dalších sekrečních drah. Všechny sekretiny mají podobné doménové uspořádání, C-terminální sekretinovou doménu a za ní nejméně dvě periplazmatické domény (Reichow et al., 2010). Sekretiny vytvářejí různé symetrie, pohybují se od C12 do C20 (Korotkov et al., 2011a). T2SS sekretinu se nejvíce podobá sekretin dráhy T3SS. I ten se u *Shigella flexneri* skládá z 12 podjednotek a ve vnější membráně vytváří strukturu několika kruhovitých částí (Hodgkinson et al., 2009). Jiným systémem, ve kterém se nachází sekretin, je pilusový systém typu IV (T4PS). *Neisseria meningitidis* T4PS sekretin vykazuje kvartérní (kvazi-dodekamerickou (C12)) symetrii (Collins et al., 2004). Jiný sekretin používají někteří bakteriofágové k opuštění hostitelské buňky. Tento kanál má C14 symetrii a je složen z tří kruhovitých domén (Opalka et al., 2003).

Je známo, že většina proteinů vnější membrány se skládá za pomoci BAM komplexu („ β -barrel assembly machinery“). To bylo potvrzeno i u sekretinu T4PS *Neisseria meningitidis* (Voulhoux et al., 2003). Skládání sekretinu T2SS *Escherichia coli* je však zřejmě nezávislé na BAM komplexu (Collin et al., 2007).

Dalším proteinem komplexu vnější membrány je lipoprotein pilotin, GspS. GspS funguje jako periplazmatický chaperon, který chrání C-terminální doménu GspD před degradací a také navádí GspD do vnější membrány. Za absence GspS se v periplazmě objevují degradační agregáty GspD (Hardie et al., 1996). Tosi et al. (2011) popsali strukturu a vazebné místo GspS. Pilotin je složen ze 4 helixů, které jsou spojeny krátkými smyčkami. Žlábek, do kterého se váže sekretinová doména GspD, je složen z nabitých i hydrofobních oblastí. GspS také brání multimerizaci GspD před vložením do vnější membrány. Samotný GspS však nestačí, aby se GspD vložilo do vnější membrány, váže se na heterodimer GspS-GspD ještě LolA (Collin et al., 2011). LolA je periplazmatický chaperon, který patří do tzv. Lol dráhy. LolA navádí lipoprotein na LolB, což je lipoproteinový receptor ukotvený ve vnější membráně. Do Lol dráhy patří ještě ABC transporter LolCDE komplex (Tokuda, 2009). Zajímavá variace na uvedený mechanismus tvorby sekretinového póru byla popsána u druhu *Pseudomonas aeruginosa*. Jeho sekretin je lipoprotein, jehož N-terminální lipidická kotva přebírá funkci pilotinu. Upravený sekretin bez lipidického N-konce se nedostal do vnější membrány a vytvářel multimery ve vnitřní membráně (Viarre et al., 2009).

2.4.2. Komplex vnitřní membrány

Komplex vnitřní membrány je tvořen třemi hlavními proteiny: GspM, GspL a GspF. GspM obsahuje krátkou cytoplazmatickou oblast, transmembránový helix a periplazmatickou doménu. Periplazmatická doména má sekundární strukturu složenou ze dvou α -helixů a čtyřech antiparalelních β -listů ($\alpha\beta\beta - \alpha\beta\beta$), tato struktura se nejvíce podobá feredoxinovému „foldu“. Periplazmatická doména GspM se podílí na dimerizaci proteinu (Abendroth et al., 2004).

GspL je zřejmě hlavní protein komplexu vnitřní membrány, vytváří homodimery. GspL má velkou cytoplazmatickou doménu, transmembránový helix a malou periplazmatickou doménu. V cytoplazmatické oblasti se nachází důlek, který interaguje s N-terminální doménou sekreční ATPázy, GspE (Abendroth et al., 2005). Gray et al. (2011) potvrdili interakci periplazmatické domény GspL s procesovaným pseudopilinem GspG. GspL by tak mohl být spojkou, která převádí konformační změny mezi cytoplazmatickou ATPázou (GspE) a periplazmatickým pseudopilem, jehož hlavní komponentou je pseudopilin GspG. Na základě koimunoprecipitací a kvasinkových dvouhybridních systémů Py et al. (2001) zjistili, že GspL interaguje s GspM přes jejich periplazmatické domény. Dále GspL tvoří komplex s GspE (jak bylo zmíněno výše) a GspF. GspL je vyžadováno pro vznik komplexu GspE-GspF, zatímco komplex GspE-GspL nevyžaduje pro svůj vznik GspF.

GspF je jako jediný z těchto proteinů polytopický, obsahuje tři transmembránové domény (TMD) a dvě cytoplazmatické, které spolu tvoří dimer, v němž se nacházejí dvě Ca^{2+} vazebná místa. Cytoplazmatické domény jsou si podobné, obě mají strukturu 6 α -helixů. (Abendroth et al., 2009).

Komplexy membrán spojuje periplazmatická spojka, GspC, která se skládá z několika domén: TMDs, HR (homology region) domény a coiled coil nebo PDZ domény. Posledně zmíněné jsou dobře známy pro svoji schopnost interakce s jinými proteiny/doménami, zde slouží zřejmě k vytvoření homomultimeru GspC (Gérard-Vincent et al., 2002). HR doména GspC interaguje s periplazmatickou N0 doménou GspD (Korotkov et al., 2011b).

Biogeneze komplexu vnitřní membrány je zřejmě závislá na komplexu vnější membrány. Lybarger et al. (2009) pomocí fluorescenčních pokusů ukázali, že GspD je důležité pro správnou lokalizaci GspC a GspM. Na základě toho navrhli, že GspD-GspC vytváří základ T2SS, na který se následně skládají další komponenty T2SS.

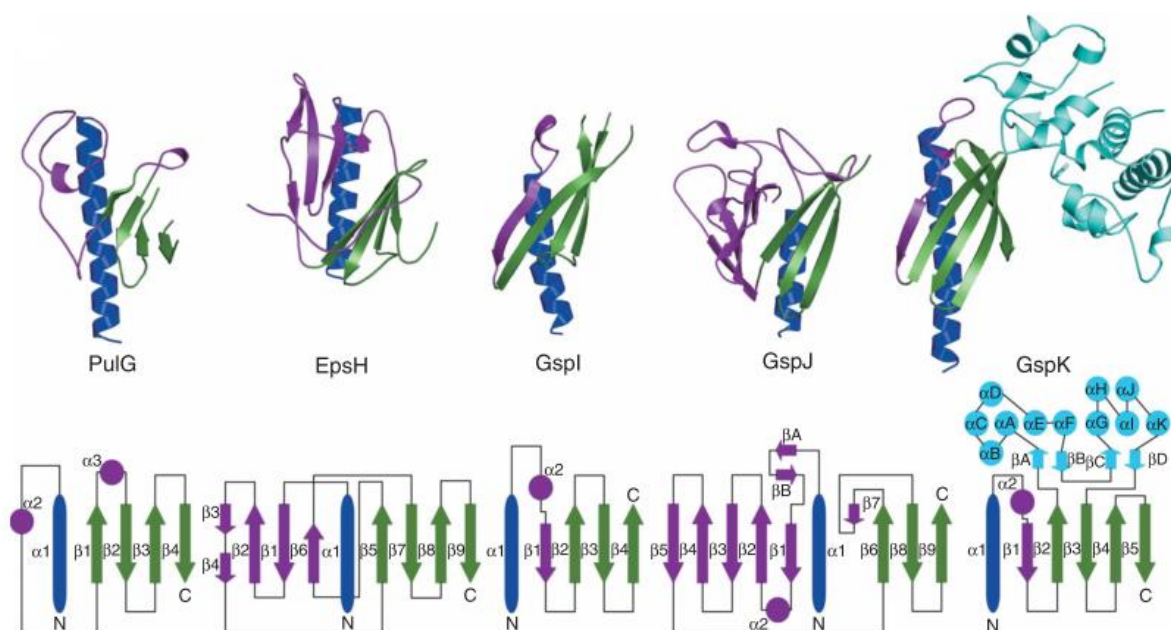
2.4.3. Sekreční ATPáza

Sekreční ATPáza GspE je cytoplazmatický protein spojený s komplexem vnitřní membrány, který hydrolýzou ATP dodává energii pro T2SS. Sestává se z N1, N2, C1, CM a C2 domény. V C2 doméně se vyskytuje několik konzervovaných oblastí: Walker A, Asp box, Walker B, His box. Walker A je vazebným místem pro nukleotid a je esenciální pro správnou funkci GspE (Possot and Pugsley, 1994). ATPáza T2SS patří do velké rodiny sekrečních ATPáz stejně jako např. archeální ATPáza nebo ATPáza T4PS, obě vytvářejí hexamer (Satyshur et al., 2007; Yamagata and Tainer, 2007).

Pro svou aktivitu GspE vyžaduje přítomnost Mg^{2+} . Navíc obsahuje i kationty Zn^{2+} koordinované tetracysteinovým motivem. Kationty tohoto kovu nejsou esenciální pro vlastní ATPázovou funkci, ale katalytická aktivita je snížena o necelých 50 %. GspE je často izolován jako monomer, ale ATPázová hydrolytická aktivita je závislá na koncentraci, což je vlastnost typická pro oligomery (Camberg and Sandkvist, 2005). ATPázová aktivita hexameru GspE je asi 20krát vyšší než u monomeru (Lu et al., 2013). Dále ATPázovou aktivitu zvyšuje vazba GspE-GspL a kyselý fosfolipid jako je např. cardiolipin (Camberg et al., 2007).

2.4.4. Pseudopilus

Pseudopilus T2SS je struktura velmi podobná pilu T4PS. Pseudopilus se skládá v periplazmě a slouží jako zatažitelná zátka pro pór ve vnější membráně nebo jako píst, který tlačí sekretované substráty přes vnější membránu (viz 2.5. Mechanismus sekrece T2SS).



Obrázek 4: Struktury pseudopilinových podjednotek. N-terminální α -helixy (modře), konzervované β -listy (zeleně), variabilní oblasti (fialově), α -doména GspK (světle modře). Páskové modely jednotlivých pseudopilinů: hlavní pseudopilin GspG *Klebsiella oxytoca* (PulG); GspH *Vibrio cholerae* (EpsH); GspI, GspJ, GspK ETEC (enterotoxigenní *E. coli*). Spodní topologické modely: β -vlákna znázorněny jako šipky, N-terminální α -helixy jako elipsy, ostatní α -helixy jako kroužky. Převzato z (Korotkov and Hol, 2008).

Skládá se z hlavního pseudopilinu GspG a čtyř vedlejších pseudopilinů GspH, GspI, GspJ a GspK. Pseudopiliny vykazují stejnou strukturu: dlouhý N-terminální α -helix následovaný variabilní oblastí a C-terminálním β -listem (Obr. 4), stejně jako pilinové podjednotky v T4PS (Köhler et al., 2004). Bylo zjištěno, že GspG váže Ca^{2+} , který je koordinován dvěma konzervovanými aspartáty. Pokud byly asparáty zaměněny za alaniny, sekrece T2SS zkolabovala (Korotkov et al., 2009). Z toho vyplývá, že vazba Ca^{2+} je nezbytná pro správnou funkci GspG.

GspH má N-terminální α -helix následovaný dvěma β -listy: β -list I tvořený $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ a $\beta 6$, β -list II tvořený $\beta 5$, $\beta 7$, $\beta 8$ a $\beta 9$. Mezi N-terminálním α -helixem a β -listy I a II se nachází hydrofobní štěrbina obsahující 17 konzervovaných zbytků, která zřejmě slouží pro vazbu na jiný protein (Yanez et al., 2008a).

GspK má složení typické pro piliny, ale ještě navíc obsahuje tzv. α -doménu. α -doména je vložena mezi $\beta 2$ a $\beta 3$ vlákno pilinové domény a obsahuje 12 α -helixů, 4 krátká β vlákna a několik smyček. Také v ní bylo nalezeno dvojvazebné místo pro Ca^{2+} kationty. Dále byla v α -doméně potvrzena disulfidická vazba mezi dvěma cysteiny, která se vyskytuje mezi pseudopiliny pouze v GspK (Korotkov and Hol, 2008). Pseudopilin GspK je také výjimečný tím, že jako jediný nemá na +5 pozici glutamát (Bleves et al., 1998).

Struktura GspI opět obsahuje N-terminální α -helix následovaný čtyřmi antiparalelními β -vláknami skládajícími se do jednoho β -listu. Je ale zajímavé, že mezi α -helixem a β -listem není téměř žádná variabilní oblast (Yanez et al., 2008b).

GspJ má za N-terminální α -helixem dva β -listy skládající se z pěti a čtyř β -vláken a navíc krátké $\beta 2'$ -vlákno, které není součástí ani jednoho β -listu. GspJ má na rozdíl od GspI rozsáhlou variabilní pilinovou oblast (Yanez et al., 2008b).

Tři posledně jmenované podjednotky spolu vytvářejí pravotočivý heterotrimer GspK-I-J tvarově připomínající baseballovou rukavici. Největší styčná plocha je mezi pilinovou i α -doménou GspK a GspJ. Uprostřed spolu interagují všechny tři N-terminální α -helixy. Ze struktury vyplývá, že tento heterotrimer se nachází na vrchu pseudopilu, α -doména GspK je nejvýše a přesahuje GspI a GspJ (Korotkov and Hol, 2008). Lokalizace GspK strukturně potvrzuje dříve pozorovaný jev, že GspK řídí délku pseudopilu (Vignon et al., 2003).

Douzi et al. (2009) navrhuje (na základě kopurifikací solubilních domén minoritních pseudopilinů) GspI jako iniciátora skládání pseudopilu. GspI se váže na odlišná místa GspK a GspJ. Dohromady tvoří výše zmiňovaný heterotrimer K-I-J, na který se přes GspJ váže GspH. GspH by mělo tvořit spojku mezi špičkou pseudopilu složenou z minoritních pseudopilinů a vlastním pseudopilem tvořeným z jednotek hlavního pseudopilu, GspG. Podjednotky GspG vytvářejí pseudopilus díky N-terminálním hydrofobním α -helixům, které tvoří svazek uprostřed pseudopilu (Köhler et al., 2004).

Aby mohl vzniknout pseudopilus, musí se nejdříve GspG a další pseudopiliny transportovat do periplazmy. GspG k inzerci využívá SRP dráhu, která rozpozná hydrofobní N-konec a kotranslačně ho navádí do Sec translokonu. GspG se tak díky Sec translokonu dostává do vnitřní membrány (Francetic et al., 2007). Stejně jako prekurzory pilinových podjednotek T4PS i prekurzor GspG je po vložení do vnitřní membrány štěpen prepilin peptidázou. Tento enzym rozpoznává rozhraní mezi krátkou pozitivně nabitou sekvencí a hydrofobní sekvencí aminokyselin, kterou štěpí za přítomnosti fosfolipidů (Nunn and Lory, 1991). Prepilin peptidáza je bifunkční enzym, který má proteolytickou funkci, ale také metyltransferázovou funkci. Po odštěpení prekurzorové sekvence metyluje N-konec GspG (Strom et al., 1993).

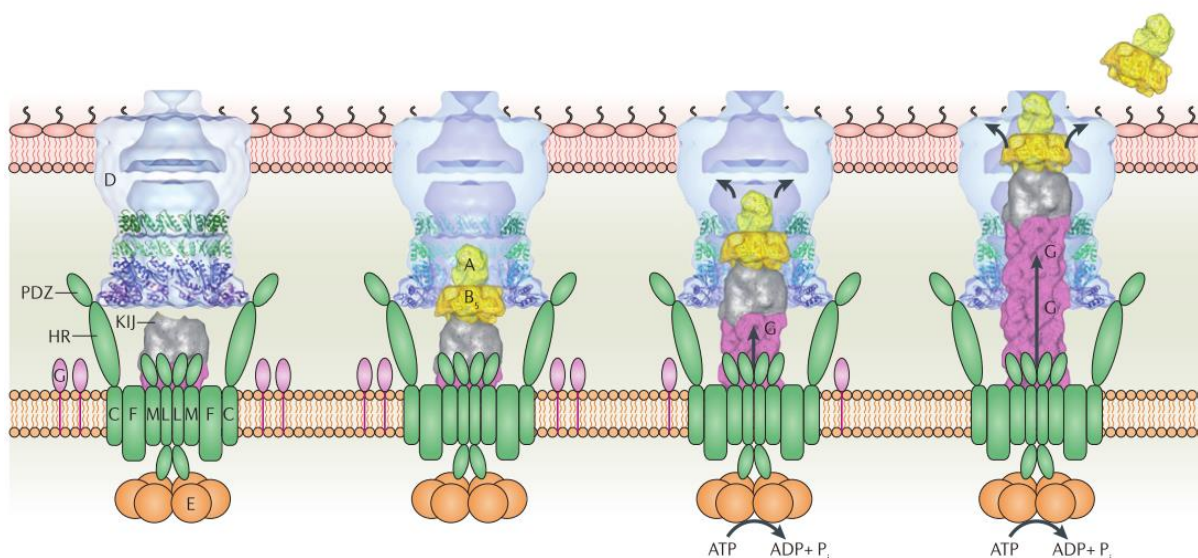
2.5. Mechanismus sekrece T2SS

Jak již bylo zmíněno dříve, T2SS přenáší sbalené proteiny přes vnější membránu. Nenašel se však žádný signál ani specifický motiv společný pro proteiny sekretované T2SS. Prerekvizitou pro přenos je zřejmě správné složení proteinu. Obecně se dá říci, že sekretované proteiny jsou bohaté na β -vlákna (Sandkvist, 2001). Exoprotein (exportovaný protein) zřejmě interaguje s N0 doménou GspD (konkrétně s β 2-vláknem), která je schopna vázat β -vlákno jiného proteinu (Korotkov et al., 2010). Douzi et al. (2011) zjistili, že exoprotein *P. aeruginosa* elastáza LasB interaguje s GspC a také s komplexem minoritních pseudopilinů GspK-I-J-H na špičce pseudopilu.

Poslední zmiňované interakce exoproteinu podporují první a více diskutovaný model mechanismu T2SS, tzv. pístový model. Vazba exoproteinu na podjednotky T2SS by měla stimulovat ATPázu, to by vedlo k přidávání GspG a prodlužování pseudopilu, který by tlačil sekretované proteiny skrz sekretinový pór. Tento model podporuje i Reichow et al. (2010), kteří studovali sekreci cholera toxinu u *Vibrio cholerae* za použití elektronové kryomikroskopie (Obr. 5). Hlavními nejasnostmi tohoto modelu je neznámá struktura

a dynamika komplexu vnitřní membrány a zatahování pseudopilu po sekreci exoproteinu (Korotkov et al., 2012).

Druhým modelem je šroubový model či model Archimédova šroubu. GspG by zde fungovalo jako spirálovitý eskalátor poháněný komplexem GspE-GspF. Komplex minoritních pseudopilinů by pak zapřičiňoval zapnutí šroubu. Jakmile by byl v pohybu transportoval by proteiny dokud by nedošel jeden ze zdrojů: podjednotky GspG nebo energie. I tento model má nezodpovězené otázky, jako např. objasnění jak exoproteiny vstupují do této dráhy (Nivaskumar and Francetic, 2014).



Obrázek 5: Možný mechanismus sekrece T2SS. ATPáza GspE znázorněna oranžově, proteiny komplexu vnitřní membrány zeleně (PDZ a HR doména GspC), minoritní proteiny pseudopilu stříbrně (GspK-I-J), hlavní pseudopilin GspG růžově, sekretinový kanál ve vnější membráně zeleně, modře a fialově. Vlevo je zobrazena architektura T2SS před vazbou exoproteinu. Druhá struktura ukazuje T2SS s exoproteinem (v tomto případě AB₅ cholerový toxin) v periplazmatickém vestibulu sekretinu. Po rozpoznání proteinu GspD/C by byl dán signál ATPáze GspE k indukci ATP hydrolýzy. ATP hydrolýza by vedla ke konformačním změnám v hexameru GspE. Tyto pohyby by byly přenášeny od ATPázy k pseudopilinu pomocí GspL, který by mohl být zapojen do přidávání pseudopilinových podjednotek. Pseudopilus by se prodlžoval do té doby než by exoprotein nebo špička pseudopilu dosáhly kontaktu s konstričním místem periplazmatického vestibulu sekretinu. Další přidávání GspG podjednotek pseudopilu by vedlo k dalšímu kontaktu exoproteinu a pseudopilu se sekretinem, což by vyvolalo konformační změny (šipky) a vyloučení exoproteinu přes periplazmatickou a extracelulární bránu. Převzato z (Korotkov et al., 2012; Reichow et al., 2010).

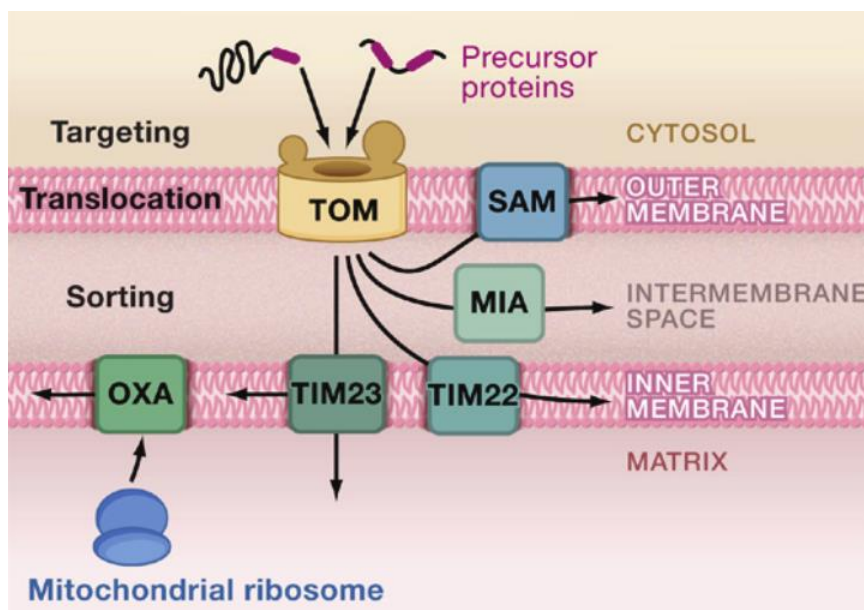
2.6. Import proteinů do mitochondrií

Eukaryotické buňky jsou složitě kompartmentalizovány. Většina proteinů se syntetizuje v cytosolu a mnoho z nich se musí transportovat přes jednu i více membrán aby dosáhly své správné lokalizace. Proteiny tedy musí být směrovány do cílových organel, transportovány přes hydrofóbní membrány tříděny a správně skládány. Jednou z těchto organel je i mitochondrie, která obsahuje čtyři specifické „sub-kompartmenty“: vnější membránu, vnitřní membránu s kristami, mezimembránový prostor a lumen mitochondrie zvané matrix. Mnoho experimentů bylo provedeno na modelovém organismu *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrie *S. cerevisiae* obsahuje více než 750 proteinů, 25 % z nich se podílí na údržbě genomu nebo genové expresi, 14% se zapojuje do energetického metabolismu, další proteiny jsou neznámé funkce nebo se podílí na transportu proteinů či metabolitů, signalizaci, metabolismu aminokyselin, lipidů či železa, mitochondriální morfologii (Sickmann et al., 2003).

1 % proteinů je syntetizováno v mitochondriální matrix, tyto proteiny byly zděděny od prokaryotního předka a patří sem především klíčové podjednotky vnitřní membrány účastníci se oxidativní fosforylace. K transportu těchto proteinů do vnitřní membrány byla v mitochondrii zachována OXA dráha („insertase/export machinery of the inner membrane“), která sestává z podjednotek Oxa1 a Oxa2 a jejímž bakteriálním homologem je YidC (Preuss et al., 2005).

Zbývajících 99 % proteinů je syntetizováno v cytosolu, tyto proteiny jsou odvozeny od prokaryot a geny, které je kódují, byly přeneseny do jádra nebo byly během evoluce vynalezeny eukaryotní buňkou. Všechny tyto proteiny se transportují do jednotlivých mitochondriálních „sub-kompartmentů“ mitochondrie pomocí jedné z několika odlišných transportních drah (Obr. 6). Vstupní bránou pro většinu mitochondriálních proteinů je TOM komplex („translocase of the outer membrane“), hlavní komponentou tohoto komplexu je Tom40 tvořící vlastní kanál (Ahting et al., 2001). Do SAM komplexu („sorting and assembly machinery“) dále pokračují β -barelové proteiny vnější membrány (Wiedemann et al., 2003). Podjednotka Sam50 tvoří kanál, zatímco Sam35 je zodpovědný za rozpoznání tzv. β -signálu na C-terminálním konci β -barelových proteinů (Kutik et al., 2008). Pro proteiny periplazmatického prostoru je určena tzv. MIA dráha („mitochondrial intermembrane space assembly“) formující disulfidické můstky, jejíž hlavní složkou je Mia40 (Chacinska et al., 2004). Mia40 vytváří přes cysteinové zbytky dočasné disulfidické můstky s importovanými periplazmatickými proteiny a iniciuje tak následné složení proteinů (Milenkovic et al., 2007).

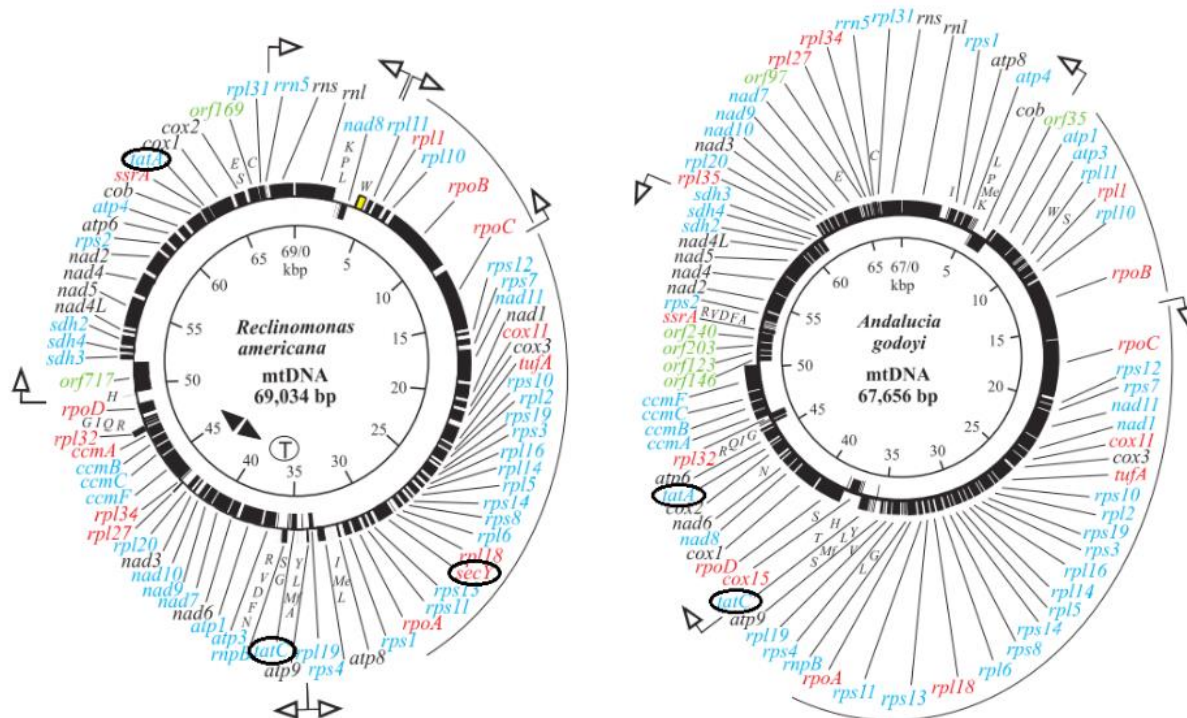
Sulfhydryl oxidáza Erv1 pak přijímá elektrony od Mia40 (reoxidace cysteinů Mia40) a přenáší je přes cytochrom c do dýchacího řetězce (Bihlmaier et al., 2007). Do TIM23 komplexu („presequence translocase of the inner membrane“) směřují proteiny vnitřní membrány, proteiny mitochondriální matrix nebo dokonce proteiny mezimembránového prostoru. TIM23 komplex je složitý aparát interagující i s okolními komplexy. Sestává se ze tří hlavních složek: Tim50, Tim23 a Tim17. Tim50 slouží jako receptor směřující proteiny z TOM komplexu do TIM23 komplexu (Mokranjac et al., 2009). Tim23 vytváří kanál v membráně a Tim17 se uplatňuje v začlenění PAM („presequence translocase-associated motor“). PAM je další důležitou částí TIM23 komplexu, jeho významnou složkou je chaperon Hsp70, který se váže na polypeptidový řetězec a řídí import do matrix za hydrolýzy ATP (Chacinska et al., 2009). Poslední hlavní translokázou je TIM22 („carrier translocase of the inner membrane“), který směřuje proteiny do vnitřní membrány. Na hydrofobní části těchto proteinů se v periplazmatickém prostoru váže hexamer chaperonů Tim9-Tim10 a navádí je na komplex TIM22 (Curran et al., 2002). Podjednotka tvořící kanál, Tim22, je pak transportuje za využití membránového potenciálu (Kovermann et al., 2002).



Obrázek 6: Třídění proteinů v mitochondrii. Translokáza vnější membrány (TOM komplex) je hlavní bránou do mitochondrie. Poté proteiny směřují do různých drah: SAM (třídící a skládací komplex vnější membrány), MIA (dráha mezimembránového prostoru), TIM22 a TIM23 (translokázy vnitřní membrány), OXA (vkládací dráha vnitřní membrány). Převzato z (Chacinska et al., 2009).

2.7. Velké mitochondriální genomy u skupiny Jakobida

Většina mitochondriálních genomů je hojně redukováná, z původního bakteriálního předka jich je u většiny zachováno zhruba 1 % genetické informace. Mitochondriální genomy jsou redukovány eliminací nadbytečných genů nebo přenesením genů do jádra. Existují však výjimky jako je exkavátní skupina Jakobida do níž se řadí rody *Jakoba*, *Histiona*, *Andalucia* nebo *Reclinomonas*. Právě mitochondriální genom *Reclinomonas americana* byl dlouho považován za genově nejbohatší a jeho analýza objevila geny pro podjednotky RNA polymerázy eubakteriálního typu nebo gen pro podjednotku Sec translokonu, které nebyly dříve nalezeny v žádném mitochondriálním genomu (Lang et al., 1997). Burger et al. (2013) analyzovali osm mitochondriálních genomů ze skupiny Jakobida a zjistili, že všechny se podobají bakteriálnímu genomu více než jakákoli do této doby zkoumaná mitochondriální DNA (mtDNA). Přestože v mitochondriálním genomu *Andalucia godoyi* chybí podjednotka Sec dráhy, bylo zde identifikováno více genů než v mitochondriálním genomu *Reclinomonas americana* (Obr. 7). MtDNA u Jakobidů obsahuje geny, jejichž produkty se účastní elektrontransportního řetězce a ATP syntézy, translace a transkripce, importu proteinů (podjednotky Tat a Sec dráhy) a dalších funkcí.



Obrázek 7: Mapa mitochondriálních genomů *Reclinomonas americana* a *Andalucia godoyi*. Barvy názvů genů podle taxonomického rozšíření: černá (geny běžné pro mtDNA), modrá (geny vyskytující se především v mtDNA protist a rostlin), červená (geny nalezeny především v mtDNA Jakobidů), zelená (hypotetické protein-kódující geny). V černých elipsách zvýrazněny geny kódující proteiny účastníci se transportu proteinů. Upraveno z (Burger et al., 2013).

2.8. T2SS v mitochondriích některých prvoků

Některé klíčové podjednotky T2SS byly v naší laboratoři objeveny v genomu těchto protistů: *Malawimonas jakobiformis*, *Malawimonas sp.* str. 249, *Andalucia godoyi*, *Reclinomonas americana*, *Naegleria gruberi*, *Naegleria fowleri*, *Neovahlkampfi damariscottae*. Většina těchto protistů patří do superskupiny Excavata, přesněji do skupin Jakobida nebo Heterolobosea, které ještě se skupinou Euglenozoa tvoří Discoba (Hampl et al., 2009). Výjimku tvoří rod *Malawimonas*, který je v poslední době často diskutován a jeho fylogenetické postavení není jasné. Nejprve byl vyloučen ze skupiny Jakobida (Hampl et al., 2009) a poté i ze superskupiny Excavata (Derelle and Lang, 2012). *Malawimonas* je podobný organismům ze skupiny Jakobida a má exkavátní morfologické znaky (O’Kelly and Nerad, 1999).

Andalucia godoyi a *Reclinomonas americana* patří do skupiny Jakobida. Jakobida jsou volně žijící, dvoubičíkaté organismy, které se živí bakteriemi. Posteriošní bičík probíhá potravním žlábkem na ventrální straně těla (O’Kelly, 1993). Jak bylo zmíněno výše Jakobida jsou známí svými velkými mitochondriálními genomy, které se podobají bakteriálním více než jakákoli jiná mtDNA.

Heterolobosea jsou zde zastoupeny rody *Neovahlkampfi* a *Naegleria*. Medicínsky nejvýznamnějším druhem je *Naegleria fowleri* způsobující onemocnění primární amébová meningoencefalitida (PAM), která byla pojmenována po doktoru (Dr. Malcolm Fowler), který jako první izoloval *N. fowleri* a popsal nemoc kterou způsobuje (Carter, 1970). Zatím největší epidemie proběhla v České Republice mezi roky 1962 a 1965, během níž zemřelo 16 mladých lidí, kteří se nakazili v plaveckém bazénu (Cerva and Novak, 1968). Při infekci proniká *N. fowleri* nosem do mozku, k onemocnění jsou náchylní především děti, které se mohou nakazit infikovanou vodou. Nedávno byl popsán případ, kdy se nakazilo dítě dokonce z kohoutkové vody při sprchování (Cope et al., 2015). Nepatogenním příbuzným *N. fowleri* je *N. gruberi*, obě améby jsou celosvětově rozšířeny. Rod *Vahlkampfi* se rozpadl na čtyři rody, včetně rodu *Neovahlkampfi* (Brown and De Jonckheere, 1999), a tyto rody jsou si více či méně příbuzné (De Jonckheere and Brown, 2005). Některé „vahlkampfidní“ améby byly podezřívány z působení lidských keratitid (Aitken et al., 1996).

T2SS je v genomech těchto eukaryot zastoupen proteiny GspD, GspE, GspF, GspG (viz níže).

3. Cíle

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat klíčové podjednotky T2SS u *Naegleria gruberi* a *Malawimonas sp.* str. 249.

Praktické cíle:

- 1) Objasnit interakce jednotlivých komponent T2SS u *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 v heterologním buněčném systému pomocí kvasinkového a bakteriálního dvouhybridního systému.
- 2) Sledovat import podjednotky GspG *N. gruberi* do mitochondrie.
- 3) Otestovat import podjednotky GspD *M. sp.* str. 249 do mitochondrie.

4. Materiál a metodika

4.1. Organismy a jejich kultivace

4.1.1. *Naegleria gruberi*

Axenická buněčná kultura trofozoitů *N. gruberi* byla použita pro izolaci mitochondrií a následný import proteinu NgGspG. Buňky byly kultivovány v médiu M7 (Fulton et al., 1984) při 27 °C s antibiotikem Pen-Strep (finální koncentrace 10 jednotek penicilinu a 10 µg/ml streptomycinu).

M7 médium

| | |
|--|---------|
| L-methionin (Sigma) | 22,5 mg |
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (Sigma) | 0,63 g |
| KH ₂ PO ₄ (Sigma) | 0,181 g |
| yeast extract (Oxoid) | 2,5 g |
| D-Glukóza (Sigma) | 2,7 g |
| dH ₂ O | 450 ml |
| inaktivované fetální bovinní sérum (gibco) | 50 ml |

Všechny složky (kromě inaktivovaného séra) byly naváženy a rozpuštěny. Poté byl roztok sterilizován přefiltrováním a bylo přidáno inaktivované fetální bovinní sérum. Fetální bovinní sérum bylo inaktivováno při 56 °C po dobu 30 min.

antibiotika: Pen-Strep (Sigma) 10 000 jednotek penicilinu a 10 mg streptomycinu/ml

4.1.2. *Escherichia coli*

Bakterie *E. coli* kmene TOP10 byly použity pro namnožení rekombinantních plazmidů. Bakterie byly kultivovány v LB médiu při 37 °C s příslušnými antibiotiky pro selekci pozitivních kolonií, ampicilin (finální koncentrace 100 µg/ml) nebo kanamycin (finální koncentrace 50 µg/ml).

Bakterie *E. coli* kmene DHT1 byly použity pro bakteriální dvouhybridní systém (BACTH = bacterial two-hybrid). Bakterie byly kultivovány v LB médiu při 37 °C.

LB médium

| | |
|-------------------|--------|
| LB (Sigma) | 20g |
| dH ₂ O | 500 ml |

LB plotny

| | |
|-------------------|--------|
| LB + agar (Sigma) | 17 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

| | | |
|--------------|-------------------|-----------|
| antibiotika: | ampicilin (Sigma) | 100 mg/ml |
| | kanamycin (Sigma) | 50 mg/ml |

4.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky *S. cerevisiae* kmene YPH499 byly použity pro izolaci mitochondrií. Kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109 byly použity pro kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H = yeast two-hybrid).

Kvasinky byly kultivovány na příslušných plotnách či v tekutých médiích při 30 °C.

YPGal médium

| | |
|-----------------------|--------|
| yeast extract (Oxoid) | 8 g |
| pepton (Oxoid) | 16 g |
| galaktóza (Serva) | 16 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

2 × YPAD médium

| | |
|---------------------------|--------|
| yeast extract | 8 g |
| pepton | 16 g |
| D-glukóza (Sigma) | 16 g |
| adenin hemisulfát (Sigma) | 40 mg |
| dH ₂ O | 500 ml |

YPD plotny

| | |
|-------------------|--------|
| yeast extract | 5 g |
| pepton | 10 g |
| D-glukóza | 10 g |
| agar (Amresco) | 6 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

SD -TRP/-LEU médium/plotny

| | |
|-----------------------------|--------|
| yeast nitrogen base (Sigma) | 3,35 g |
| drop out -TRP/-LEU (Sigma) | 0,77 g |
| D-glukóza | 10 g |
| (agar) | 6 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

SD -TRP/-LEU/-HIS plotny

| | |
|---------------------------------|--------|
| yeast nitrogen base | 3,35 g |
| drop out -TRP/-LEU/-HIS (Sigma) | 0,73 g |
| D-glukóza | 10 g |
| agar | 6 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

SRAF -URA

| | |
|---------------------|--------|
| yeast nitrogen base | 3,35 g |
| drop out -URA | 0,96 g |
| rafinóza (Sigma) | 10 g |
| agar | 6 g |
| dH ₂ O | 500 ml |

4.2. Plazmidy

Pro BACTH byly použity plazmidy pUT18c a pKT25. Pro Y2H byly použity plazmidy pGADT7 a pGBKT7. Pro *in vitro* translaci NgGspG byl použit kontrolní plazmid s dihydrofolát reduktázou (DHFR). Pro expresi M249GspD v kvasinkách byl použit plazmid pYES2.0 se zaklonovaným GFP.

4.3. Amplifikace genů

Příslušné geny byly amplifikovány pomocí metody PCR (polymerase chain reaction). Jako templátová DNA byla použita genomová DNA *Naegleria gruberi* nebo uměle nasyntetizovaná DNA v případě genů pro *Malawimonas. sp.* str. 249 (Genscript). Primery byly navrženy podle sekvencí genů a obsahovaly restriční místa pro klonování. V případě více než 50% obsahu GC párů v sekvenci byl použit enhancer.

Tabulky primerů:

primery vytvoření konstruktů pro import NgGspG do mitochondrií:

| GspG, restriční místa NdeI, BamHI | |
|--|------------------------------|
| forward | CATGCATATGCACAATAGCAAAACC |
| reverse | CATGGGATCCTTATTCGCCACCACCGCT |

primery vytvoření konstruktů pro interakci proteinů *N. gruberi* pomocí metody Y2H:

| GspD, restriční místa NdeI, BamHI | |
|--|------------------------------|
| forward | GACTCATATGTTCAAAAGCCCGATT |
| reverse | CTGAGGATCCTTAATCGTTTTTCAGGCT |

| GspE bez N-koncové mitochondriální presekvence, restriční místa NdeI, BamHI | |
|--|------------------------------|
| forward | GACTCATATGCCTGCAACTGATGTCAAA |
| reverse | CTGAGGATCCTTAAACACTGTTCTGTAA |

| GspF bez N-koncové mitochondriální presekvence, restriční místa NdeI, BamHI | |
|--|------------------------------|
| forward | GACTCATATGTCTCATCCAGGTTTGTTG |
| reverse | CTGAGGATCCTTACTTATTAGCAGTGAC |

| GspG bez N-koncové mitochondriální presekvence, restriční místa NdeI, BamHI | |
|--|------------------------------|
| forward | CATGCATATGCACAATAGCAAAACC |
| reverse | CATGGGATCCTTATTCGCCACCACCGCT |

primery vytvoření konstruktů pro interakci proteinů *M. sp.* str. 249 pomocí metody Y2H:

| GspD, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|---|-------------------------------------|
| forward | CATGCATATGATGAGCTGCAGCGCGGAG |
| reverse | CATGGGATCCTTACAGCGCGGTTGCAC |

| N-koncová doména GspD, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|--|--------------------------------------|
| forward | CATGCATATGGCGAGCGCGCCGGAGCCG |
| reverse | CATGGGATCCTTAAAATTCTGAAGTTGCT |

| GspE bez N-koncové mitochondriální presekvence, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|---|-------------------------------------|
| forward | CATGCATATGGTTGCATTGCCAAGAAGT |
| reverse | CATGGGATCCTTAAACAAAATTTCTAA |

| GspF bez N-koncové mitochondriální presekvence, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|---|-------------------------------------|
| forward | CATGCATATGAGACAATCAAAGCCATCT |
| reverse | CATGGGATCCTTATTGTGCGTCACCACC |

| GspG1 bez N-koncové mitochondriální presekvence, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|--|-------------------------------------|
| forward | CATGCATATGAGATTGGCTGAAGCAAGA |
| reverse | CATGGGATCCTTATCTTTGTAAACTTG |

| GspG2 bez N-koncové mitochondriální presekvence, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|--|--------------------------------------|
| forward | CATGCATATGAGAAAGTTGCAAGATATG |
| reverse | CATGGGATCCTTATTCCAAAGATTTCAGC |

| Potenciální substrát T2SS GspZ, restrikční místa NdeI , BamHI | |
|---|--------------------------------------|
| forward | CATGCATATGGAGGACGATGCCGAACCGT |
| reverse | CATGGGATCCTTAAACTTTGGTCCAGTT |

primery pro interakci proteinů *M. sp.* str. 249 pomocí metody BACTH:

| GspD, restrikční místa XbaI , BamHI | |
|---|-------------------------------------|
| forward | CACTCTAGAGATGAGCTGCAGCGCGGAG |
| reverse | CACGGATCCTTACAGCGCGGTTTGCAC |

| N-koncová doména GspD, restrikční místa XbaI , BamHI | |
|--|-------------------------------------|
| forward | CACTCTAGAGATGGCGAGCGCGCCGG |
| reverse | CACGGATCCTTAAAATTCGAAGTTGCTG |

| GspE, restrikční místa XbaI , KpnI | |
|--|-------------------------------------|
| forward | CACTCTAGAGATGAATTTGGAAATCGA |
| reverse | CACGGTACCTTAAACAAAATTTTCTAAG |

| GspF, restrikční místa EcoRV , BamHI | |
|--|-------------------------------------|
| forward | CACGATATCGATGTTAGGTTTCAGGTAG |
| reverse | CACGGATCCTTATTGTGCGTCACCAC |

| GspG1, restrikční místa XbaI , BamHI | |
|--|------------------------------------|
| forward | CACTCTAGACACTTTAGTTGAAATGTT |
| reverse | CACGGATCCTTATCTTTGTAAAACTTG |

| GspG2, restrikční místa EcoRV , BamHI | |
|---|-----------------------------------|
| forward | CACGATATCCTCTTTGGCAGAAATCG |
| reverse | CACGGATCCTTATTCCAAAGATTCAG |

| GspZ, restrikční místa XbaI , BamHI | |
|---|-------------------------------------|
| forward | CACTCTAGAGATGGAGGACGATGCGA |
| reverse | CACGGATCCTTAAACTTTGGTCCAGTTT |

50µl PCR reakce:

| | |
|---------------------------------|------------|
| 5 × Q5 reaction buffer | 10 µl |
| Q5 High-fidelity DNA polymerase | 0,5 µl |
| 10mM dNTPs | 1 µl |
| 100µM forward primer | 0,5 µl |
| 100µM reverse primer | 0,5 µl |
| templátová DNA | 0,5 - 1 µl |
| (5 × Q5 High GC enhancer) | 10 µl |
| sterilní H ₂ O | x µl |

PCR program:

| | |
|-----------------------|-------|
| 1. 98 °C | 30 s |
| 2. 98 °C | 10 s |
| 3. 55 °C | 20 s |
| 4. 72 °C | 30 s |
| 5. 30 cyklů kroků 2-4 | |
| 6. 72 °C | 2 min |
| 7. 4 °C | ∞ |

Některé DNA fragmenty se nepodařilo amplifikovat pomocí tohoto základního PCR programu. V těchto případech se prováděla optimalizace teploty nasedání primerů nebo byl použit optimalizovaný PCR program, ve kterém se v každém cyklu zvyšovala teplota o 1 °C.

4.4. Izolace a klonování DNA fragmentů

Vzorky DNA byly analyzovány na horizontální elektroforéze v 1% agarózovém gelu. DNA byla detekována pomocí UV transiluminátoru díky přidání interkalačního barviva SYBR Safe (Invitrogen) před zatuhnutím gelu. Nejprve byl vzorek smíchán s 6 × koncentrovaným vzorkovým pufrem (Fermentas) a nanesen na gel. Velikosti DNA byly vztaženy k standardu Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

DNA byla izolována z gelu použitím High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Vektor (plazmid) i inzert (požadovaný fragment DNA) byly štěpeny restričními enzymy (Fermentas, NEB) podle uvedeného protokolu. Restriční produkty byly vyčištěny opět za pomoci High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Naštěpený vektor i inzert byly dále ligovány T4 DNA ligázou (Fermentas) podle uvedeného protokolu při 16 °C přes noc.

4.5. Transformace bakterií

K chemicky kompetentním bakteriím *E. coli* byla po rozmražení přidána ligační reakce. Po krátkém protřepání byla reakce ponechána 15 min na ledu. K uzavření buněčné membrány kompetentních bakterií došlo tepelným šokem 45 s při 42 °C. Poté byla reakce vrácena na led. Po uplynutí 5 min bylo přidáno 500 µl LB média. Bakterie byly dále inkubovány 1 hodinu na třepačce při 37 °C, 220 RPM. Poté byly bakterie rozetřeny na LB plotny s náležitým selekčním antibiotikem a inkubovány při 37 °C přes noc.

Několik narostlých kolonií bylo vždy otestováno na přítomnost daného genu pomocí PCR. Jako templátová DNA sloužila DNA z rozbitých bakterií. Výsledek byl analyzován pomocí horizontální elektroforézy.

Pozitivní kolonie byly inkubovány v 5 ml LB média s příslušným selekčním antibiotikem na třepačce při 37 °C, 220 RPM přes noc. Z bakteriální kultury byl izolován plazmid použitím High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid). Koncentrace daného miniprepu byla měřena na nanodropu.

Dále byla provedena kontrolní restrikce příslušnými restrikčními enzymy a výsledek byl opět analyzován na horizontální elektrofréze. Při správném vyštěpení inzertu byla DNA osekvenována.

4.6. Import proteinu do mitochondrií

4.6.1. *In vitro* translace

Pro *in vitro* translaci byl použit PURE Express *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB). Nejprve byl do kontrolního (DHFR) vektoru s T7 promotorem zaklonován NgGspG. Do dalšího kontrolního vektoru s T7 promotorem byl zaklonován chimerický gen Su9 (podjednotka 9 kvasinkové ATPázy s myší DHFR). Do translačních reakcí byl přidán (mimo roztoky obsažené v kitu) RNAsin (Promega) jako inhibitor RNáz a radioaktivně značený methionin (³⁵S-methionin, MP). Translační reakce byly inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin.

translační reakce (25 μ l) :

| | |
|---------------------|-------------|
| solution A | 10 μ l |
| solution B | 7,5 μ l |
| RNAsin (Promega) | 1 μ l |
| plasmid | 250 ng |
| ³⁵ S-Met | 2 μ l |
| H ₂ O | x μ l |

4.6.2. Izolace mitochondrií *N. gruberi*

Mitochondrie pro jednu importní řadu byly izolovány z 200 ml narostlé kultury *N. gruberi*. Buňky byly stočeny při 1 500 \times g, 10 min, 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v 1 \times PBS. Buňky byly znovu stočeny při 1 500 \times g, 10 min, 4 °C. Pelet byl resuspendován v 20 ml ST pufru s inhibitory proteáz (Roche). Buňky byly sonikovány na sonikátoru Q125 (Qsonica) po dobu 1 min (puls 1 s, pauza 1 s, amplituda 30 %) a stočeny při 800 \times g, 15 min, 4 °C. Pelet obohacený o mitochondrie byl resuspendován v 100 μ l ST pufru s inhibitory proteáz a použit na import proteinu nebo zmrazen v tekutém dusíku a skladován v -80 °C.

ST pufr

| | |
|-------------------|-----------|
| sacharóza | 42,85 g |
| TRIS (Sigma) | 0,6 g |
| KCl | 18,5 mg |
| dH ₂ O | do 500 ml |

Upravit pH na hodnotu 7,2 pomocí HCl a uchovávat v -20 °C.

4.6.3. Izolace kvasinkových mitochondrií

Nejprve byla provedena měření růstu buněk a zhotovena růstová křivka (jak rychle daný kmen bakterií roste v daném médiu).

Pro izolaci kvasinkových mitochondrií byl použit kmen YPH499. Prekultura kvasinek byla nasazena do 4 l YPG média na OD₆₀₀ = 0,05 a kvasinky byly kultivovány přes noc (12 h) při 30 °C, 220 RPM do OD₆₀₀ = 0,1. Buňky byly stočeny při 3 000 \times g, 10 min a resuspendovány v 20 ml destilované H₂O. Poté znovu stočeny při 3 000 \times g, 5 min. Buňky byly resuspendovány v 20 ml Tris-DTT pufru a inkubovány při 30 °C, 15 min s mírným třepáním. Buňky byly stočeny při 3 000 \times g, 5 min. Buňky byly resuspendovány v 20 ml

předehřátého (30 °C) 1,2M sorbitol pufru a stočeny při 3 000 × g, 5 min. Bylo odváženo 2,5 mg zymolyázy na každý gram buněk. Zymolyáza byla rozpuštěna v předehřátém (30 °C) sorbitol pufru (2 ml na každý gram buněk). Pelet buněk byl resuspendován v tomto roztoku a inkubován při 30 °C, 30 min s mírným třepáním. Buňky zbavené buněčné stěny byly stočeny při 3 000 × g, 5 min. Od této doby byly všechny kroky prováděny na ledu nebo ve 4 °C. Buňky byly dvakrát resuspendovány v 15 ml 1,2M sorbitol pufru a stočeny při 3 000 × g, 5 min, 4 °C. Po druhém stočení byly buňky resuspendovány v 25 ml BB 6,0 obsahující inhibitory proteáz (Roche). Buňky byly homogenizovány mechanicky pomocí těsného Dounceova homogenizátoru a po každých 30 stlačeních zkontrolovány pod mikroskopem. Homogenát byl stočen při 3 000 × g, 5 min, 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a držen na ledu. Pelet byl opět resuspendován v 25 ml BB 6,0 obsahující inhibitory proteáz, mechanicky homogenizován a homogenát stočen za stejných podmínek. Oba supernatanty byly spojeny a stočeny při 4 000 × g, 5 min, 4 °C pro odstranění tzv. low-speed peletu, který obsahuje převážně zbytky buněčné membrány a endoplazmatického retikula. Tento krok byl dvakrát opakován a vytvořený pelet odstraněn. Výsledný supernatant byl stočen při 12 000 × g, 30 min, 4 °C. Pelety byly opatrně resuspendovány v 0,5 ml BB 6,0. Poté byla přibližně určena koncentrace mitochondrií: měření A_{280} 2 vzorků. Jako blank bylo použito 10 μ l BB 6,0 s 990 μ l 0,6% SDS, jako vzorek na stanovení koncentrace 10 μ l mitochondriálního peletu s 990 μ l 0,6% SDS. Hodnota 0,21 odpovídá zhruba koncentraci 10 mg/ml v neředěné směsi. Následně byl vzorek znovu stočen při 12 000 × g, 10 min, 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v BB 7,4 do koncentrace 25 mg/ml a bylo přidáno fatty acid free BSA do koncentrace 10 mg/ml. Mitochondrie byly rozpipetovány do alikvót po 10 μ l a rychle zmrazeny v tekutém dusíku. Následně byly skladovány v -80 °C.

YPG médium

| | |
|-------------------|--------|
| yeast extract | 50 g |
| pepton | 100 g |
| glycerol | 150 ml |
| dH ₂ O | do 5l |

Pufrovat kyselinou mléčnou na pH 5.

Tris-DTT pufr: 0,1M Tris-SO₄, upravit na pH 9,4 (pomocí H₂SO₄) / 10mM DTT

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 1M Tris-SO ₄ , pH 9,4 | 10 ml |
| 1M DTT | 1 ml |
| dH ₂ O | do 100 ml |

Namíchat čerstvý před použitím.

1,2M Sorbitol pufr: 1,2M sorbitol / 20mM KPi pH 7,4

| | |
|-------------------|-----------|
| 2,4M sorbitol | 250 ml |
| 1M KPi, pH 7,4 | 10 ml |
| dH ₂ O | do 500 ml |

1M KPi pH 7,4

| | |
|------------------------------------|---------|
| 1M K ₂ HPO ₄ | 80,2 ml |
|------------------------------------|---------|

| | |
|------------------------------------|---------|
| 1M KH ₂ PO ₄ | 19,8 ml |
|------------------------------------|---------|

Upravit pH na 7,4.

BB 6,0: 0,6M sorbitol / 20mM K⁺MES, pH 6,0

| | |
|-------------------------------|-----------|
| 2,4M sorbitol | 200 ml |
| 1M K ⁺ MES, pH 6.0 | 16 ml |
| dH ₂ O | do 800 ml |

BB 7,4: 0,6M sorbitol / 20mM K⁺HEPES, pH 7,4

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 2,4M sorbitol | 25 ml |
| 1M K ⁺ HEPES, pH 7,4 | 2 ml |
| dH ₂ O | do 100 ml |

2,4M sorbitol byl rozmíchán v deionizované H₂O.

4.6.4. Import proteinu do mitochondrií

Import proteinu byl sledován v časech 0, 1, 2, 4, 8 a 16 min. v čase 16* min byl sledován import do mitochondrií s narušeným membránovým potenciálem. Nejprve byly připraveny mikrozkušky s 100 µl STOP pufru. Radioaktivně značený substrát byl smíchán s 8M ureou (v poměru 1:1) pro denaturaci proteinu. K vyizolovaným mitochondriím byl přidán 1 ml BSA importního pufru a organely byly stočeny při 10 000 × g, 5 min, 4 °C. Pelet

byl resuspendován v importním mixu a inkubován při 25 °C, 5 min. Mezitím byla odebrána poměrná část do mikrozkušavky se STOP pufrům označená časem 0 min a byl k ní přidán radioaktivně značený substrát. Dále byla zvlášť odebrána poměrná část mitochondrií do mikrozkušavky s 1 µl AVO mixu (16* min) a inkubována stejně jako zbytek mitochondrií v 25 °C. Ke zbylým po 5 min aktivovaným mitochondriím a ke vzorku 16* byl přidán radioaktivní substrát s ureou. V jednotlivých časech byla odebírána poměrná část mitochondrií do předem připravených mikrozkušavek se STOP pufrům, které byly drženy na ledu. Nakonec byl takto zastaven import i v oddělené mikrozkušavce s AVO mixem (16* min). Dále bylo do všech zkumavek přidáno 16 µl proteinázy K (0,5 mg/ml) a směs byla inkubována 10 min na ledu. Poté bylo do všech mikrozkušavek přidáno 4 µl 100 × PMSF (inhibitor serinových proteáz). Importní směsi byly stočeny při 16 600 × g, 10 min, 4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn, aby nebyl porušen pelet. Pelety byly promyty v promývacím pufru a opět stočeny při 16 600 × g, 10 min, 4 °C. Supernatant byl opět opatrně odstraněn. Dále byly vzorky resuspendovány v 20 µl vzorkového pufru pro SDS-PAGE.

BSA importní pufr

| | |
|--|-----------|
| fatty-acid free BSA (bovine serum albumin) | 6 g |
| sacharóza | 17,1 g |
| KCl | 1,19 g |
| MgCl ₂ . 6H ₂ O | 0,2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 54 mg |
| methionin | 0,15 g |
| MOPS | 0,42 g |
| dH ₂ O | do 200 ml |

Upravit pH pomocí KOH na 7,2.

Importní mix

| | |
|--------------------------|--------|
| BSA import pufr | 800 µl |
| 0,2M NADH | 10 µl |
| 0,2M ATP | 10 µl |
| 0,1M methionin | 50 µl |
| kreatin kináza (10mg/ml) | 10 µl |
| 0,5M kreatin fosfát | 20 µl |

AVO mix: 1uM valinomycin, 20uM oligomycin, 8uM antimycin

| | |
|--|-------------|
| valinomycin (1mM zásobní roztok v etanolu) | 100 μ l |
| oligomycin (10mM zásobní roztok v etanolu) | 200 μ l |
| antimycin (8mM zásobní roztok v etanolu) | 100 μ l |
| ethanol | 600 μ l |

stop pufr: 2 \times CCCP

| | |
|-------------------|------------|
| 5mM CCCP | 25 μ l |
| BSA importní pufr | 1 ml |

promývací pufr: 1 \times CCCP

| | |
|-------------------|------------|
| 5mM CCCP | 50 μ l |
| BSA importní pufr | 4 ml |

5mM CCCP (carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone) rozpustit v ethanolu a skladovat v -80 °C.

4.6.5. SDS-PAGE

Pro analýzu importu proteinu v jednotlivých časech byla použita metoda SDS-PAGE, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného. Proteinové vzorky byly smíchány s 20 μ l vzorkového pufru (1 \times koncentrovaný), denaturovány v bločku při 80 °C po dobu 10 min a naneseny na gel. Byl použit 13,5% gel. SDS-PAGE byla pod napětím 90 - 150 V. Relativní molekulová hmotnost byla určena pomocí standardu (ThermoFisher).

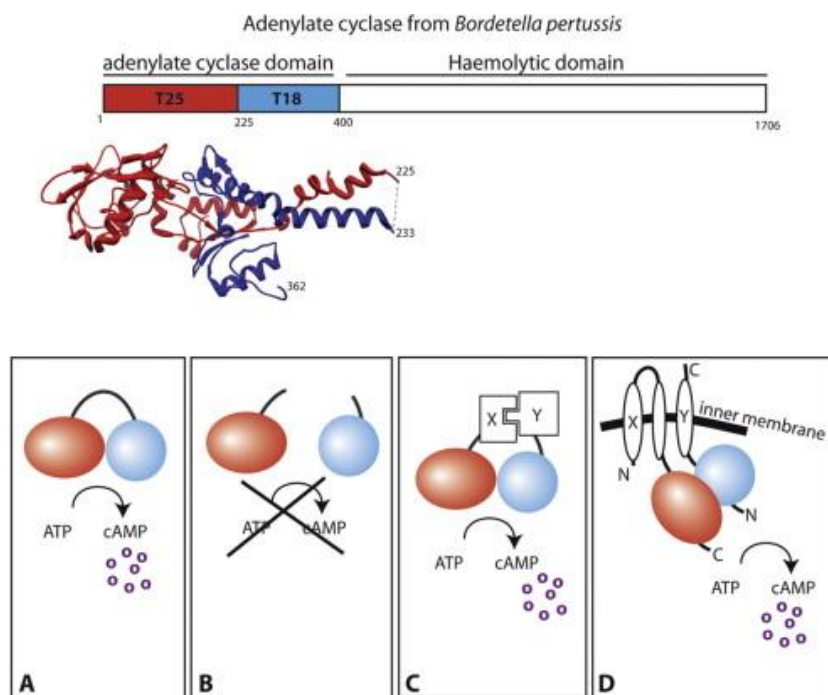
4.6.6. Vysušení gelu, založení, vyvolání

Po SDS-PAGE byl gel vysušen v sušičce gelů a založen do desek pro expozici radioaktivně značeného vzorku. V prvních pokusech byl na detekci radioaktivity použit rentgenový film, který byl exponován přes noc a poté vyvolán. V pozdějších pokusech byla na detekci radioaktivity použita deska pro phosphorimaging.

Pro detekci signálu byl využit zobrazovací přístroj Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare), který umožňuje rychlejší zobrazení a snadnou kvantifikaci značeného vzorku. Následná analýza vzorku byla provedena pomocí programu ImageQuant.

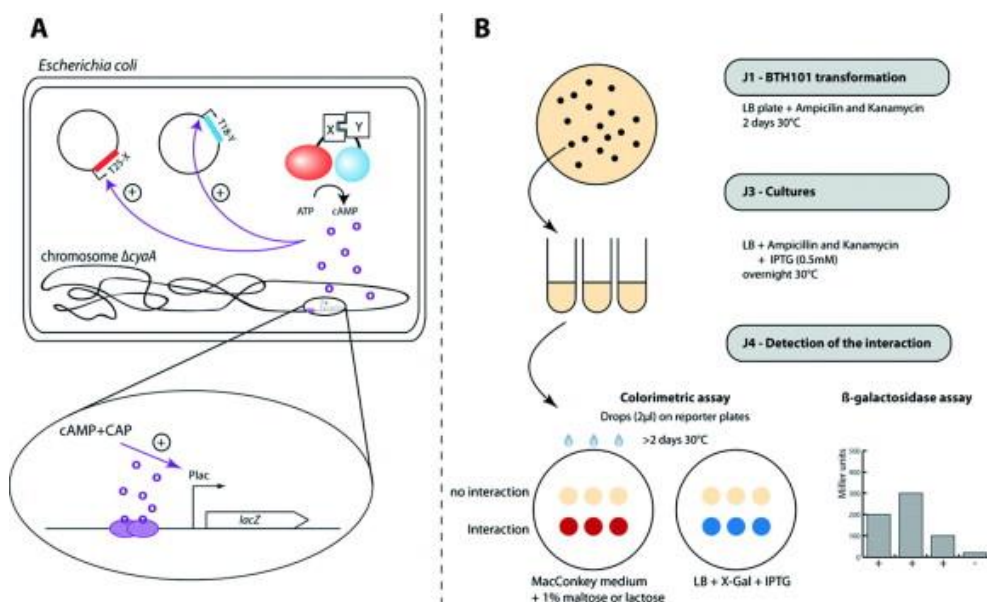
4.7. Bakteriální dvouhybridní systém

Bakteriální dvouhybridní systém (BACTH) byl popsán v publikaci Karimova et al. (1998). BACTH umožňuje detekovat interakci dvou proteinů díky katalytické doméně adenylátcyklázy *Bordetella pertussis* (původce černého kašle). Tato katalytická doména se skládá ze dvou komplementárních fragmentů T25 a T18 (názvy podle velikosti: 25 a 18kDa), (Obr. 8).



Obrázek 8: Organizace adenylátcyklázy *Bordetella pertussis* a základ BACTH metody založen na reorganizaci T18 a T25 podjednotek. A: Zbytková syntéza cAMP při expresi adenylát cyklázy v *E. coli* cya^- kmene. B: Žádné cAMP není produkováno, pokud jsou podjednotky T18 a T25 produkovány odděleně. C: Pokud dojde ke kontaktu podjednotek T18 a T25 díky interakci dvou proteinů X a Y, je v buňce obnovena produkce cAMP. D: Princip metody pro membránové proteiny. Převzato z (Battesti and Bouveret, 2012).

Pokud jsou tyto podjednotky v cya^- kmeni (deletovaný gen kódující adenylátcyklázu) bakterie *E. coli* asociovány s interagujícími proteiny (tj. dochází ke kontaktu T18 a T25 podjednotek), spouští syntézu cAMP, který indukuje expresi β -galaktosidázy (Obr. 9). Síla interakce může být měřena kolorimetricky na plotnách (LB-X-gal nebo MacConkey médium s maltózou) nebo měřením β -galaktosidázové aktivity.



Obrázek 9: Protokol pro BACTH metodu. A: *E. coli* *cya*⁻ kmen je transformován dvěma kompatibilními plazmidy nesoucích hybridy s T18 a T25 podjednotkami. Interakce proteinů X a Y zapříčiňuje, že se podjednotky dostanou k sobě a obnovují syntézu cAMP. cAMP indukuje expresi operonů laktózy a maltózy a také zvyšuje expresi hybridních genů. B: Transformované bakterie jsou vysety na LB plotny s ampicilinem a kanamycinem. Kolonie jsou poté kultivovány přes noc v tekutém médiu a následně je stanovena interakce proteinů pomocí kolorimetrických měření nebo pomocí měření β -galaktosidázy. Převzato z (Battesti and Bouveret, 2012).

4.7.1. Zaklonování genů do vektorů

Nejprve byly geny zaklonovány do vektorů pUT18c (obsahující gen pro 18 kDa podjednotku adenylátcyklázy) a pKT25 (obsahující gen pro 25 kDa podjednotku adenylátcyklázy).

4.7.2. Příprava kompetentních bakterií

Pro přípravu kompetentních bakterií byl použit druh *E. coli* kmene DHT1. Nové kompetentní bakterie nejprve podstoupily tepelný šok (45 s při 42 °C, poté na led). Dále byly natřeny na LB plotnu s X-gal (Sigma) a IPTG (Sigma). 1 bílá (světlá) kolonie byla vyizolována, inokulována do 5 ml LB média a kultivována při 37 °C přes noc. 2 ml prekultury byly inokulovány do 500 ml LB média a kultivovány při 37 °C do $OD_{600} = 0,6$. Kultivační láhev byla zchlazena na ledu na kývačce po dobu 10 min. Bakterie byly stočeny v předchlazených (na ledu) zkumavkách a rotoru při $4\,200 \times g$, 10 min. Supernatant byl odstraněn a bakterie byly opatrně resuspendovány v 200 ml studeného sterilního 0,1M $CaCl_2$. Poté byly bakterie inkubovány 20 min na ledu, stočeny při $4\,200 \times g$, 10 min. Supernatant byl odstraněn a bakterie byly resuspendovány v 8 ml studeného 0,1M $CaCl_2$ a přidán glycerol

(finální koncentrace 15 %). Alikvóty 0,5 ml bakteriální suspenze byly rozděleny do 1,5 ml zkumavek a zmrazeny v tekutém dusíku (skladovány v -80 °C) nebo ihned použity k transformaci.

4.7.3. Kotransformace bakterií

Do mikrozkušavek byly pipetovány 1 - 3 µl každého rekombinantního plazmidu (pUT18c, pKT25) s vloženým příslušným genem, prázdné plazmidy jako negativní kontrola a rekombinantní plazmidy s geny kódující ověřené interagující proteiny jako pozitivní kontrola. Množství plazmidu bylo upravováno podle úspěšnosti transformace, obecně by měla koncentrace plazmidu dosahovat 20 - 50 ng. Zkušavky s plazmidy byly zchlazeny na ledu a do každé zkušavky bylo přidáno 50 µl DHT1 kompetentních bakterií. Dále byly inkubovány 30 min na ledu a poté byly vystaveny tepelnému šoku při 42 °C po dobu 1 min a poté zchlazeny na ledu. Bakterie byly převrstveny 250 µl LB média a kultivovány při 37 °C, 220 RPM. Po uplynutí 30 min byly bakterie rozetřeny na plotny obsahující ampicilin (100 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml). Kotransformované bakterie byly kultivovány při 30 °C, 48 - 96 hodin.

4.7.4. Měření β-galaktosidázy (výpočet Millerových jednotek)

Z každé plotny byly vybrány 3 kolonie. 1 kolonie byla inokulována do zkušavky obsahující 1 ml LB média s ampicilem (100 µg/ml) a kanamycinem (50 µg/ml). Bakterie byly kultivovány přes noc v 30 °C, 220 RPM. Další den ráno bylo inokulováno 0,25 ml prekultury do 5 ml LB média obsahující stejnou koncentraci ampicilinu a kanamycinu a 1mM IPTG. Bakterie byly kultivovány při 30 °C, 220 RPM do $OD_{600} = 1 - 1,5$. Byla změřena OD_{600} bakteriální kultury (pro přesnější měření byla kultura 10 × naředěna). Ve skleněných zkušavkách bylo smícháno 0,5 ml bakterií s 0,5 ml Z pufru. K této směsi bylo přidáno 20 µl chloroformu a každá zkušavka byla vortexována 10 s. Zkušavky byly inkubovány 5 min při 28 °C ve vodní lázni. Reakce byla započata přidáním 0,2 ml ONPG (4 mg/ml, čerstvě naředěného v Z pufru). Jakmile se vyvinula citrónově žlutá barva, byla reakce ukončena přidáním 0,5 ml 1M Na_2CO_3 . Doba reakce byla zaznamenána v minutách. Reakční mix byl stočen při 16 600 × g, 5 min. Nakonec byla změřena OD_{420} supernatantu a vypočítány Millerovy jednotky podle běžného vzorce:

$$\frac{OD_{420} \times 1\,000}{(T1-T0) \text{ (min)} \times V \text{ (ml)} \times OD_{600}}$$

Z pufr

M63 médium 50 ml

1M DTT 40 μ l

10% SDS 15 μ l

M63 médium

KH₂PO₄ 13,6 g

(NH₄)₂SO₄ 2 g

FeSO₄ · 7H₂O 500 μ l

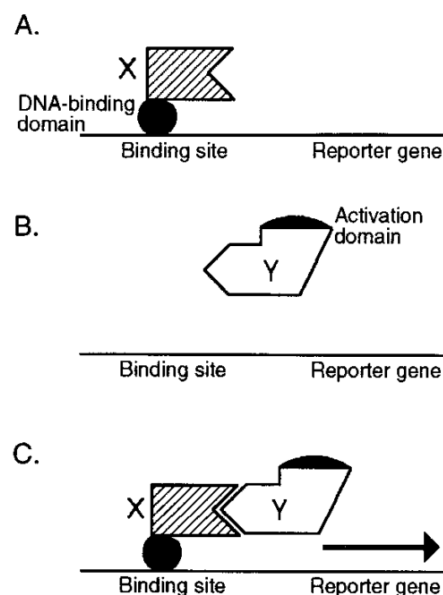
MgSO₄ · 7H₂O 245 mg

dH₂O do 1000 ml

Upravit pH na 7 (KOH).

4.8. Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H)

Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H) umožňuje detekovat interakci dvou proteinů. Poprvé byl popsán Fields and Song (1989). Proteiny jsou spojeny s doménami transkripčního faktoru (Obr. 10). Pokud proteiny interagují, dostávají se k sobě GAL4 aktivační a vázající doména transkripčního faktoru a je spuštěna transkripce daného genu (v našem případě HIS3). Tuto transkripční aktivitu můžeme detekovat na plotnách s minimálním médiem.



Obrázek 10: Y2H. A: DNA vázající hybridní doména neaktivuje transkripci, pokud protein X neobsahuje aktivační doménu. B: Aktivační hybridní doména neaktivuje transkripci, protože není lokalizována na DNA vázající doménu. C: Interakce mezi proteiny X a Y přináší aktivační doménu do blízkosti DNA vázající domény a spouští transkripci. Převzato z (Phizicky and Fields, 1995).

4.8.1. Kotransformace kvasinek

Nejprve byly geny zaklonovány do vektorů pGADT7 (obsahující gen pro aktivační doménu transkripčního faktoru) a pGBKT7 (obsahující gen vazebnou doménu transkripčního faktoru).

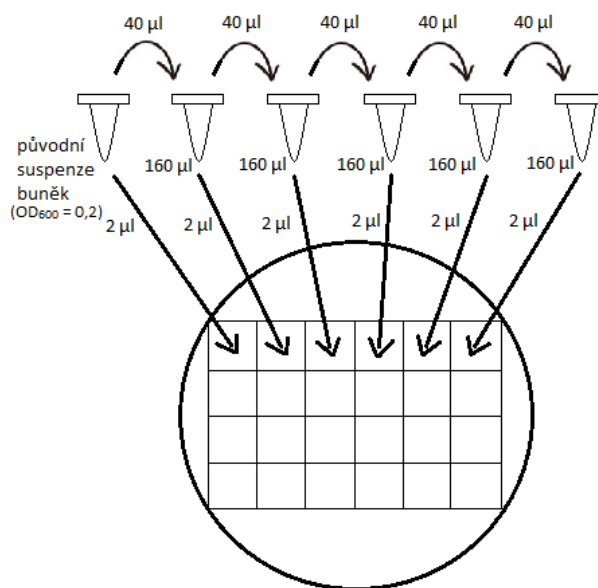
První den byl kvasinkový kmen AH109 inokulován do 5 ml $2 \times$ YPAD média a inkubován přes noc na třepačce při 30 °C, 200 RPM. Druhý den byla změřena OD₆₀₀ narostlé kultury (naředěno, aby se hodnota pohybovala do 1). Kvasinková kultura byla naředěna do 50 ml $2 \times$ YPAD média s OD₆₀₀ = 0,2 a inkubována na třepačce při 30 °C, 200 RPM do OD₆₀₀ = 0,8. Buňky byly stočeny při 3 000 × g, 5 min, promyty v 25 ml sterilní H₂O a resuspendovány v 1 ml sterilní vody. Mezitím byla denaturována (95 °C, 5 min) přenašečová DNA (salmon sperm DNA = SS DNA) a poté zchlazena na ledu (zamezení DNA renaturaci). Buňky byly dány do mikrozkušavky a stočeny při 3 000 × g, 1 min, byl odstraněn supernatant. Dále bylo 100 µl buněk resuspendováno v 400 µl H₂O, zvortexováno a rozděleno po 50 µl do mikrozkušavek pro každou transformaci. Buňky byly stočeny při 3 000 × g, 1 min a byl odstraněn supernatant. Dále byly k buňkám postupně přidávány jednotlivé roztoky v daném pořadí.

| | |
|-------------------------------------|--------|
| PEG 3500 50% w/v | 240 µl |
| LiAc 1.0 M | 36 µl |
| denaturovaná SS DNA | 50 µl |
| plazmidová DNA (5 µl + 5 µl) + voda | 34 µl |
| celkem | 360 µl |

Každá transformace byla následně vortexována 1 min. Transformované buňky byly inkubovány při 42 °C po dobu 40 min. Buňky byly stočeny při 3 000 × g, 1 min a byl odstraněn supernatant. Kvasinky byly dále resuspendovány v 500 µl vody a natřeny na plotny: 250 µl na plotnu SD -TRP/-LEU, 250 µl na plotnu SD -TRP/-LEU/-HIS. Na každou plotnu bylo také rozetřeno antibiotikum kanamycin (finální koncentrace 50 µg/ml). Plotny byly inkubovány při 30 °C po dobu 3 - 4 dnů, dokud se neobjevily kolonie.

4.8.2. Rozkapání (Serial dilution test)

Z plotny byla inokulována 1 kolonie do 5 ml SD -TRP/-LEU s ampicilinem (finální koncentrace 100 µg/ml) a inkubována přes noc při 30 °C, 200 RPM. Buňky byly stočeny při 3 000 × g, 1 min, supernatant byl odstraněn. Kvasinky byly rozmíchány ve sterilní vodě do OD₆₀₀ = 0,2 a dále rozředěny do ředící řady (Obr. 11). Plotny byly inkubovány při 30 °C.



Obrázek 11: Původní suspenze buněk o $OD_{600} = 0,2$ byla postupně ředěna ředící řadou $20\times$, $200\times$, $2\,000\times$, $20\,000\times$, $200\,000\times$. $2\,\mu\text{l}$ z každého ředění byly nanесeny do řady na plotně. Plotny byly inkubovány při $30\,^{\circ}\text{C}$.

4.9. Fluorescenční značení *S. cerevisiae*

4.9.1. Transformace buněk *S. cerevisiae*

K transformaci byla použita kultura *S. cerevisiae* kmene AH109 narostlá na plotně YPD. Z plotny byla do mikrozkušavky seškrábnuta suspenze přibližně $100\,\mu\text{l}$ buněk a následně promyta v $0,5\,\text{ml}$ H_2O . Buňky byly stočeny při $3\,000 \times g$, $1\,\text{min}$ a supernatant odsán. K peletu buněk byl přidán $1\,\text{ml}$ 100mM LiAc, mix byl jemně promíchán a stočen při $3\,000 \times g$, $1\,\text{min}$. (Mezitím byla denaturována ($95\,^{\circ}\text{C}$, $5\,\text{min}$) přenašečová DNA (salmon sperm DNA = SS DNA) a poté zchlazena na ledu (zamezení DNA renaturaci)). Byl odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno $400\,\mu\text{l}$ 100mM LiAc a buňky rozsuspendovány. $50\,\mu\text{l}$ buněk bylo přendáno do nové mikrozkušavky, do níž byly dále postupně přidány a jemně promíchány tyto složky (v předepsaném pořadí): $240\,\mu\text{l}$ 40% PEG, $36\,\mu\text{l}$ 1M LiAc, $50\,\mu\text{l}$ SS DNA, $3\,\mu\text{l}$ plazmidu (pYES2.0-EGFP + M249GspD) + $31\,\mu\text{l}$ H_2O . Mix byl vortexován $1\,\text{min}$ a dále inkubován při $30\,^{\circ}\text{C}$ po dobu $30\,\text{min}$ a poté při $42\,^{\circ}\text{C}$ po dobu $30\,\text{min}$. Transformované buňky byly stočeny při $3\,000 \times g$, $30\,\text{s}$, resuspendovány v $300\,\mu\text{l}$ H_2O , rozetřeny na plotnu SRAF-URA a inkubovány při $30\,^{\circ}\text{C}$ po dobu $3\,\text{dnů}$, dokud se neobjevily kolonie. Zdroj uhlíku byl zajištěn rafinózou, aby se potlačila exprese z galaktóзовého promotoru plazmidu. Plazmid obsahoval gen URA3, který umožnil transformovaným kvasinkám růst na plotně s minimálním médiem bez uracilu.

4.9.2. Fluorescenční značení buněk *S. cerevisiae*

Transformované kvasinky byly setřeny z plotny SRAF-URA, rozmíchány v 5 ml YPGal a třepány při 30 °C, 220 RPM po dobu 4 hodin k navození indukce exprese konstruktů *M249GspD-GFP*. Poté byly stočeny při $3\,000 \times g$, 2 min. Kvasinky byly resuspendovány v 1 ml $1 \times$ PBS a byla k nim přidána fluorescenční barva MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) v ředění 1 : 10 000, která umožňuje specifické živé značení mitochondrií. Od této doby byly kvasinky drženy ve tmě. Následovala inkubace při 30 °C po dobu 20 min. Dále byly kvasinky stočeny při $3\,000 \times g$, 1 min a dvakrát promyty v $1 \times$ PBS. Na podložním skle bylo smícháno 15 μ l buněk s 15 μ l rozehráté 2% low-melting agarózy (Sigma), vzniklá suspenze byla přikryta krycím sklem. Poté jsme vzorek ihned pozorovali na mikroskopu (Nikon Eclipse Ti).

5. Výsledky

5.1. Bioinformatická analýza Gsp

Nejprve byly v naší laboratoři (Mgr. Vojtěch Žárský) objeveny čtyři podjednotky T2SS (GspD, GspE, GspF, GspG) u těchto eukaryotických organismů: *Naegleria fowleri*, *Naegleria gruberi*, *Neovahlkampfia damariscottae*, *Reclinomonas americana*, *Andalucia godoyi*, *Malawimonas jakobiformis* a *Malawimonas sp.* str. 249, patřících do skupiny Discoba a Malawimonada. Poté byly manuálně dohledány (Doc. Mgr. Marek Eliáš, Ph.D., Romain Derelle, Ph.D.) další izomery některých genů (GspE1, E2, E3, E4; GspG1, G2). Pro identifikaci dalších možných komponent byla ve spolupráci s Romainem Derellem provedena srovnávací analýza genomů výše zmíněných organismů. V seznamu takto identifikovaných 42 genech unikátních pro studované genomy byly nalezeny GspND (N-terminální doména GspD) a potenciální substrát GspZ. GspZ byl navržen jako případný substrát kvůli několika konzervovaným histidinům (často váží hemy) a cysteinům (často váží FeS centra), viz 5.1.1. Alignmenty Gsp proteinů. Právě proteiny vážící hemy nebo FeS centra jsou častými substráty T2SS.

U výše zmíněných organismů bylo postupně odhaleno osm genů T2SS včetně izomerních forem, komplexita bakteriálního T2SS je však mnohem větší (Tab. 2).

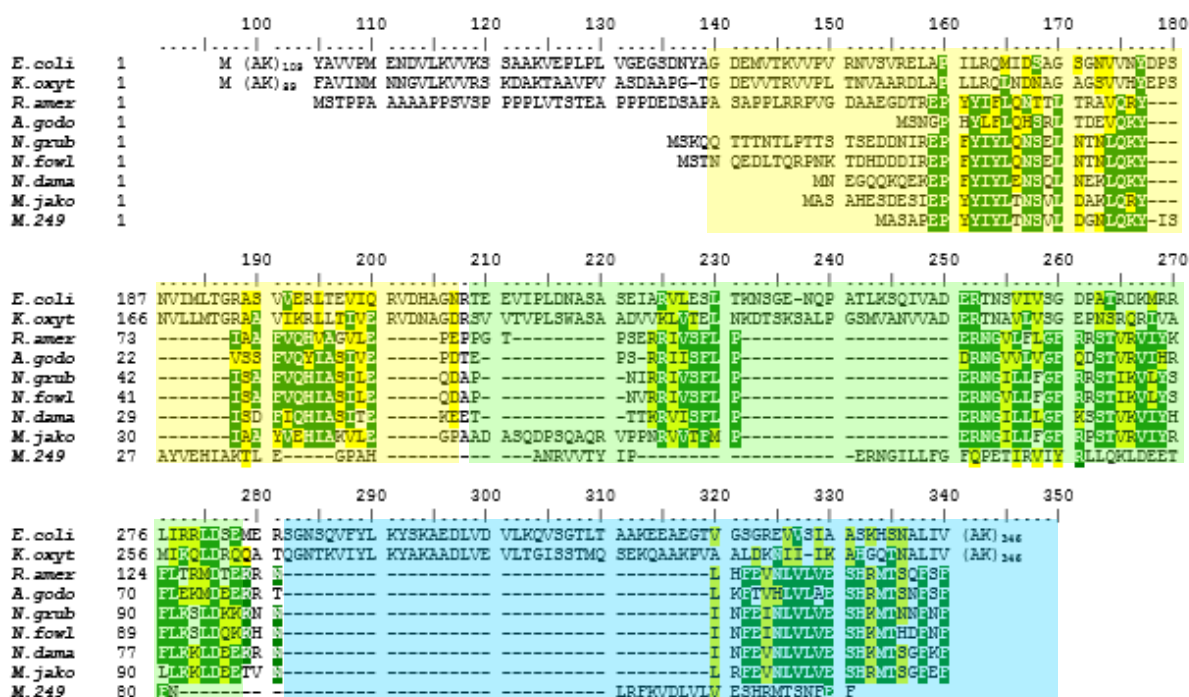
Tabulka 2: Přehled bakteriálních a eukaryotických komponent T2SS. Barvy (zeleně - přítomnost, červeně - nepřítomnost) značí výskyt Gsp genů u daných druhů organismů, první dva druhy zastupují bakterie.

| | | E. coli | K. oxytoca | R. americana | A. godoyi | N. gruberi | N. fowleri | N. damariscottae | M. jakobiformis | M. sp. str. 249 |
|----------------------|------|---------|------------|--------------|-----------|------------|------------|------------------|-----------------|-----------------|
| neznámá funkce | GspB | | | | | | | | | |
| protein vnitřní mem. | GspC | | | | | | | | | |
| sekretní | GspD | | | | | | | | | |
| sekreční ATPáza | GspE | | | | | | | | | |
| protein vnitřní mem. | GspF | | | | | | | | | |
| hlavní pseudopilin | GspG | | | | | | | | | |
| vedlejší pseudopilin | GspH | | | | | | | | | |
| vedlejší pseudopilin | GspI | | | | | | | | | |
| vedlejší pseudopilin | GspJ | | | | | | | | | |
| vedlejší pseudopilin | GspK | | | | | | | | | |
| protein vnitřní mem. | GspL | | | | | | | | | |
| protein vnitřní mem. | GspM | | | | | | | | | |
| neznámá funkce | GspN | | | | | | | | | |
| prepilin peptidáza | GspO | | | | | | | | | |

5.1.1. Alignmenty Gsp proteinů

Z alignmentů jednotlivých proteinů je dobře rozpoznatelná homologie s bakteriálními komponentami T2SS. V alignmentech jsou zastoupeny bakteriální organismy: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* a eukaryotní organismy: *Andalucia godoyi*, *Reclinomonas americana*, *Naegleria gruberi*, *Naegleria fowleri*, *Neovahlkampfia damariscottae*, *Malawimonas jakobiformis*, *Malawimonas sp.* str. 249 (Obr. 12-16). V posledním alignmentu GspZ zastoupeném pouze protisty je dobře vidět několik konzervovaných cysteinů a histidinů (Obr. 17). Alignmenty byly vytvořeny využitím ClustalW, který je součástí programu BioEdit.

Analýzou eukaryotických sekvencí byla u proteinů GspE, GspF a GspG identifikována pravděpodobná mitochondriální presekvence (MTS = „mitochondrial targeting sequence“), viz 5.1.3. Mitochondriální presekvence Gsp proteinů.



Obrázek 12: Alignment později objevené N-koncové domény GspD. Žlutě vyznačena N1 doména, zeleně N2 doména, modře N3 doména. Předcházející N0 doména se vyskytuje pouze u bakteriálních zástupců. Vlastní membránová doména sekretinu je u eukaryot obsažena jako samostatný protein (viz obrázek níže).

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|-------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|----------------|-------------|-------------|
| | | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 |
| <i>E. coli</i> | 1 | M (AK) 220 | VLKQVSGTLT | AAKEEAEGETV | GSGREVVVIA | ASKHSNALIV | TAPQDINQSF | QSVIEQLDIR | RAQVHVEALIT | VEVAEGSGIN |
| <i>K. oxyt</i> | 1 | M (AK) 220 | VLTCISSTMQ | SEKQAAKFVA | ALDKNII-IK | ARQQTNALIV | TAAPDVMDL | ERVIDQLDIR | RPQVIVELII | AEVQDADGLN |
| <i>R. amer</i> | 1 | | | | | MLPLVQSLW | RNLPERLSRI | WRNLINWKSQS | RTERRAESAS | TQSVRTVSA- |
| <i>A. godo</i> | 1 | | | | | MFAVLVSVL | TWVARGRLR | RRGTVCINER | SFLCFVLAHG | VAGQAVESSA- |
| <i>N. grub</i> | 1 | | MENTLQPMST | NSLD----FK | VLNNNVKERN | NLSIIIQRII | NNILSVLKGI | FK-SNTSMNT | NNNMFKSPIS | NSGDDDSNN- |
| <i>N. fowl</i> | 1 | | MRNIFSSSTS | HSSHSSSSMF | ILKDLIR--- | FVWSILSQFI | PSFNKRGRRV | SN-TTITITT | TTDFHNTSNT | NS-ITSSSL- |
| <i>N. dama</i> | 1 | | | | | MKILI | ENIKIIRYI | LK-IFNN--- | -----LWFPQ | KQTETQENE- |
| <i>M. jako</i> | 1 | | SRFGFC | YCGHFLASFI | VRSEHWGLAV | YMSQHLLGIW | RFVPRIWPSI | LSGSIAALAS | WYINRINRRA | FVVQPSSEEM- |
| <i>M. 249</i> | 1 | | MSCS | AEAEQSGQQS | ISDQLLAPFR | ISWLSIRHAY | RLITTSWS-- | GRGILVAVIA | VVYFLSRRR | GHSFAALHS- |
| | | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 |
| <i>E. coli</i> | 382 | FGVQNGSKDA | GLMQFANGTQ | IPIGTILGAAI | SAAKPQMGST | VISENGATTI | NPDTHGDLST | LAQLLEGFSG | TAVGVVKGDM | MGALVQAVKND |
| <i>K. oxyt</i> | 365 | LGIQWANKMA | GMTQFTN-SG | LPST---AI | AGANQYNKDG | TVS----- | -----SS | LASALSFPNG | ILAGFVQGNW | ANLLTALS |
| <i>R. amer</i> | 49 | | | | | | | -----LEM | QALESTSAV | ATVVDSDIIT |
| <i>A. godo</i> | 49 | | | | | | | -----AGL | QTVTCATGA | ASVAG |
| <i>N. grub</i> | 75 | | | | | | | -----TAS | SSFECSCHI | YSDLEN--QQ |
| <i>N. fowl</i> | 75 | | | | | | | -----TTK | QQQDSCHI | NSYLENDHH |
| <i>N. dama</i> | 37 | | | | | | | -----TII | QRFPSELEY | LSNQYS--- |
| <i>M. jako</i> | 77 | | | | | | | -----FLT | KACQISALMM | AANAPADP- |
| <i>M. 249</i> | 72 | | | | | | | -----VQA | VEGCVSLMA | MANEPTGNAG |
| | | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 |
| <i>E. coli</i> | 472 | SSSNVLSTPS | ITTLDMQEAR | FMVGQGVFVL | TGSTVGSNNS | NPFNTVERKK | VGIMLKVIEQ | INEGNAVQVW | EQEVSKEVEG | QTS-----LD |
| <i>K. oxyt</i> | 418 | TKNDILATPS | IVTLDMMEAT | FMVGQGVFVL | TGSQTTSQD- | NIFNTVERKT | VGIMLKVIEQ | INEGDSVILE | EQEVSSEVAD | AASSTSSDLG |
| <i>R. amer</i> | 82 | EPESSTAVL | | | | | | -----APQST | MGASSTSAIR | IKKQFT |
| <i>A. godo</i> | 67 | | | | | | | -----VRSSNQCMR | IKKQFT | |
| <i>N. grub</i> | 106 | SIKPN | -----HINH | -----DDKPLQIM | N-----QID | IQFNKCIQS- | -----TALPS | MNSSEKTEA | IKKQFT | |
| <i>N. fowl</i> | 108 | NIQPMNVVPLF | SMHHQMHTTS | VVGDDPHQLL | TTFLIPMSNN | VEFHKCDASS | SYLLPSSLSF | SSSSKYQAMR | IKKQFT | |
| <i>N. dama</i> | 50 | KMIPV---- | ----- | -----VVGDDPHQLL | ----- | ----- | -----SD | ELSSSEKTEA | IKKQFT | |
| <i>M. jako</i> | 98 | | | | | | | -----AVSMLA | SRSSSEKTEA | IKKQFT |
| <i>M. 249</i> | 105 | LG----- | ----- | ----- | ----- | ----- | -----GL | ALSSSEKTEA | IKKQFT | |
| | | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 |
| <i>E. coli</i> | 557 | VVFGERKLEK | TVIANGCELI | VLCPLMDQGA | GESVAVVPLP | GDIE--LIGN | LSKSTADKKE | RRNLIVFFSP | TILADGMALD | GVSGRYNYM |
| <i>K. oxyt</i> | 507 | ATFNIRTVNN | AVIVGSGETV | VVGCLLDKGV | SDTADKVPLE | GDIE--VIGA | LSRSTSKKVS | RRNLIVFFSP | TVIRADDEYR | QASSGQYTA |
| <i>R. amer</i> | 113 | -----TQT | ALIDKE-WVP | SYACSFALST | ELARVRSPI | SDIE--FLER | LPSSSEFMLV | KSAILVFFITV | RTSAAGRPQV | TQS |
| <i>A. godo</i> | 83 | -----TQT | AGRVRF-SDS | QFLCSFALST | ELARVRSPI | ADIE--FLKH | WPSRDEFLV | KSAILVFFITV | HVSPYRPVLA | INDIAEQIED |
| <i>N. grub</i> | 156 | -----TST | NLIRKEDKFP | HFVCSFANST | ELAKIRKSPI | SDIE--FLSD | LPSSSEFMLV | KSAILVFFITV | SLKND | |
| <i>N. fowl</i> | 184 | -----AST | NLIRKEDKFP | HFVCSFANST | ELAKIRKSPI | SDIE--FLSD | LPSSSEFMLV | KSAILVFFITV | SLKND | |
| <i>N. dama</i> | 88 | -----FQT | NVLEEF-WQP | TYVCASSSTT | ELQIVKRSPE | SVLE--FLRD | LPSSSEFMLV | KSAILVFFITV | KYSDKXTNQL | KGNVIXK |
| <i>M. jako</i> | 121 | -----TQT | SLMDKE-WQA | TYVCAFAISN | ELAKIRKSPI | SDIE--LIGD | LPSSSEFMLV | KSAILVFFITV | RASATGSGPR | LTQQQQPMML |
| <i>M. 249</i> | 125 | -----TQT | SLMDKE-WQT | TYACSFALAS | ELAKIRKSPI | SDIE--VVOQ | LPSSSEFMLV | KSAILVFFITV | HKSSQALAA | FVQIAL |
| | | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | | | | |
| <i>E. coli</i> | 645 | RAEQIYR--D | EQGLSLMPHT | AQPILPAQNG | ALPFEVRAFL | NAGRTR | | | | |
| <i>K. oxyt</i> | 595 | NDAQSKQRGK | ENNDAMLSMD | LLEIYFRAQDT | AAFRQVSAAI | DAFNLGQNL | | | | |
| <i>R. amer</i> | | | | | | | | | | |
| <i>A. godo</i> | | | | | | | | | | |
| <i>N. grub</i> | | | | | | | | | | |
| <i>N. fowl</i> | 267 | SSISGCHGSG | G | | | | | | | |
| <i>N. dama</i> | | | | | | | | | | |
| <i>M. jako</i> | 201 | QTIDARY | | | | | | | | |
| <i>M. 249</i> | | | | | | | | | | |

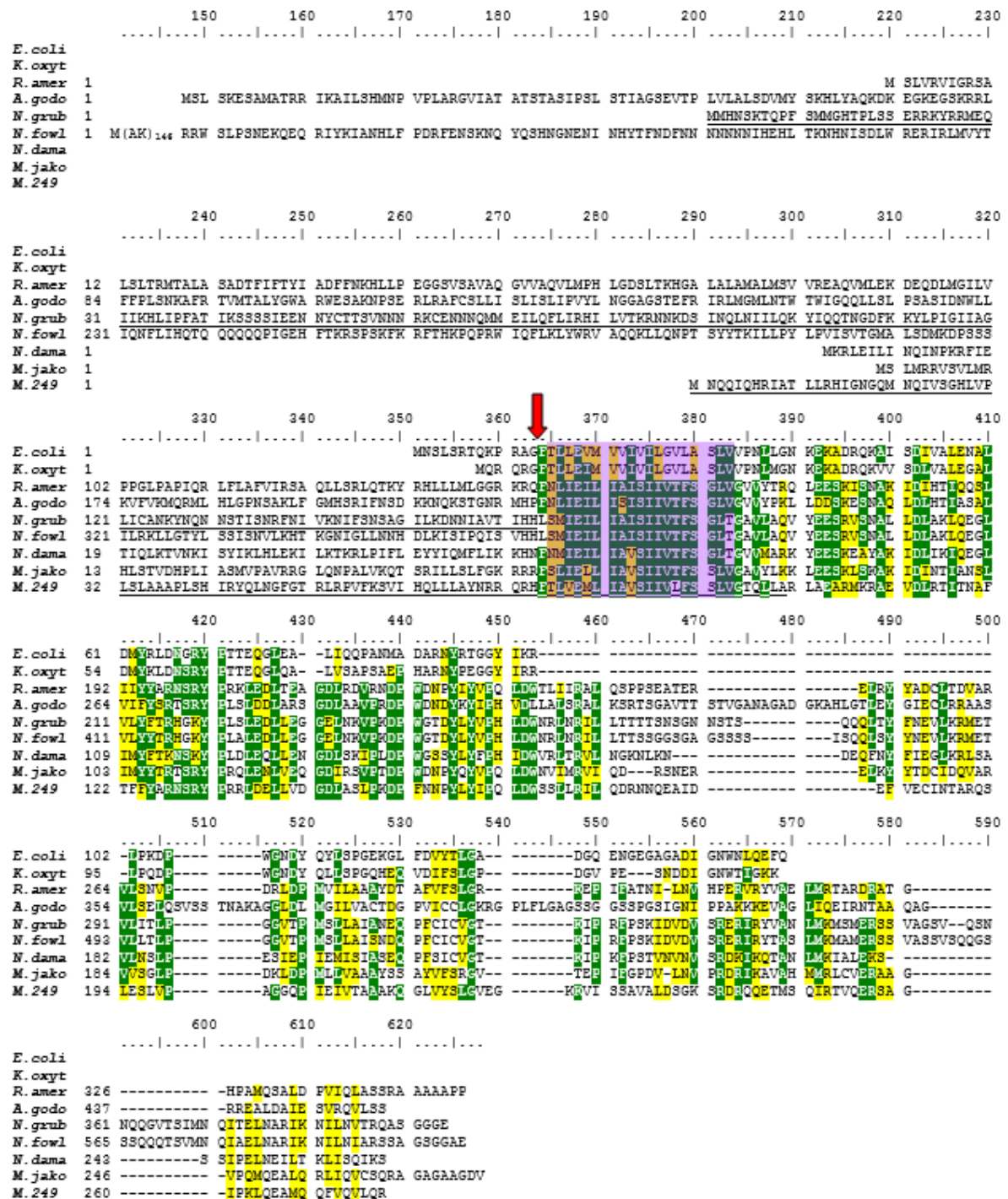
Obrázek 13: Alignment GspD. Z alignmentu je patrná absence N-terminální části proteinu u eukaryotických zástupců. Tato část proteinu, která představuje jeho solubilní periplazmatickou část, existuje u studovaných eukaryot jako samostatný protein (viz obrázek výše).

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| <i>E. coli</i> | 1 | MVPVAQETTA | NTVALPYSFS | RRFSLVANCE | ASLEILHVHP | LSLSVLQELQ | RGLNAPFTLR | QIDEAEFEQR | LNAVWQRDS | EARQLMEDLG |
| <i>K. oxyt</i> | 1 | MMFARER | RPLLPFSYAR | AHNVILLSNG | ASCEVFCLAA | TAPQTLLER | RVAGMPFSLE | RLEAEAEFKL | LVLSTQRDSA | EARRMMADIG |
| <i>R. amer</i> | | | | | | | | | | |
| <i>A. godo</i> | | | | | | | | | | |
| <i>N. grub</i> | 1 | | | | | | | | MLQGENGAGQ | QSLHEKEKQR |
| <i>N. fowl</i> | 1 | MMKRKWA | GKRQDQSEDN | NNNITTFSSS | SSAQSMVGSS | NEEMKRSRV | TILRHLMNV | FKVQDSPTNV | KAHSEAPNKO | RDEEQDTKRN |
| <i>N. dama</i> | | | | | | | | | | |
| <i>M. jako</i> | | | | | | | | | | |
| <i>M. 249</i> | | | | | | | | | | |
| | | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| <i>E. coli</i> | 91 | SAEDFFTLAE | ELPETEDLLE | SDDDAPIIKL | INAMLAELAK | EGASDIHIE | FEKSLVIRFR | VDGTLHEMLR | PGKRLASLLV | SRIKVMARLD |
| <i>K. oxyt</i> | 88 | NELDLTYLAE | ELPDTDDLLD | SEDDAPIIRL | INAMLEAIK | EKASDIHIE | VERHLQIRFR | VDGVLREILR | PQRRLAALLI | SRIKVMASLD |
| <i>R. amer</i> | 1 | MEEGSQ | AVAADSQRAG | RARSRITALL | SHMFPRATLL | TALLRSPHDA | QSSATNAHER | VMAKAVVEED | EVGEGDEEEG | LITLQKALQQ |
| <i>A. godo</i> | 1 | | | | | | | | MYQFPASLEH | SQSERILDAD |
| <i>N. grub</i> | 21 | SRLTTLRLHL | SPNVFKVKES | INNLOQSSNS | SLNTSESSER | DNPQENIQNE | EDIMLPVKAL | FHSMKNPSNR | NSQQNFEESE | RSSMNSMPNS |
| <i>N. fowl</i> | 88 | QFSSSLRTKD | QEPIDNEELK | QNNNQWINFE | ANNRENAVEN | FVNQQLSAD | DVNDENIILP | VKALFHAMGN | PQNRKSSSEF | SKSFQSSYQT |
| <i>N. dama</i> | 1 | | | | | | | | MSDEKTK | NRLDILLKQI |
| <i>M. jako</i> | 1 | | | | | | | | MEIDGKVHS | RIQRLLSHLG |
| <i>M. 249</i> | 1 | | | | | | | | MNLEI | DSIFKRVQRR |
| | | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| <i>E. coli</i> | 181 | IAEKRVQPDG | RIALLSGRA | IDVRSVTMPS | AWGERVVLR | LDKNSVMDL | LTLCAPPALL | QVVDGLIARF | HGIVLDTSP | GSGKSTLYA |
| <i>K. oxyt</i> | 178 | IAEKRIQPDG | RIALLSGRA | VDVRSVTMPS | SYGERVVLR | LDKNSVMDL | LTLCAPPALL | QVVDGLIARF | HGIVLDTSP | GSGKSTLYA |
| <i>R. amer</i> | 87 | SMASEATPKV | IDRRLLGFPR | IVANETIFSR | VMEQVYQEEK | QVIEDSLVE | MPKGPPELIT | ELFG--DEFP | SGHVCTVSP | GSGKSTIVRG |
| <i>A. godo</i> | 21 | QSPHEHVVRL | LSHIS--- | ATLTASFVR | ALERTYKVKV | ILDMKMLDE | VPKGPPELIR | VLFP--LGAP | SGHCTVSP | GSGKSTIVRG |
| <i>N. grub</i> | 111 | GLSKEEINKK | QNKWNIGFPA | EDVRSVTMPS | EMERVTSTK | PLMERSLVE | QPKGPPELID | KVFG-SKMGQ | GGHVCTVSP | GSGKSTIVRG |
| <i>N. fowl</i> | 178 | MSHAELNKK | QNKWNIGFPA | EDVRSVTMPS | EMERVTSTK | PLMERSLVE | QPKGPPELIS | KVFG-SKMGQ | GGHVCTVSP | GSGKSTIVRG |
| <i>N. dama</i> | 28 | ISNATETKKK | PDKKLGFPR | VEAKATIFSR | VMEKVTYKTK | KVIEGGLVE | MPKGPPELID | KVFG-SKMGQ | GGHVCTVSP | GSGKSTIVRG |
| <i>M. jako</i> | 30 | SPGEVAARSR | LPPRMIGFPR | ATAVKMFSR | VTEKIYNLQ | VVKESLVE | LPKGPPELE | KVFG-SKMGQ | GGHVCTVSP | GSGKSTIVRG |
| <i>M. 249</i> | 26 | SSIAVSDGDS | KPRAGVALER | AKVNTQIFST | VTEKPYDKVD | ILQETKMLVE | LPKGPPELE | KVFG-SKMGQ | GGHVCTVSP | GSGKSTIVRG |
| | | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| <i>E. coli</i> | 271 | GLQEDNNH-- | SRNHTDELH | VEMLIEGIGQ | TQVN----- | ---TRVGMIFA | RGLRDIHQD | PDVVMVGEIR | DTETATIPVQ | ASTLGHVLS |
| <i>K. oxyt</i> | 268 | ALSRUDAR-- | ERNHTDELH | VEMLIEGIGQ | TQVN----- | ---AKVDMIFA | RGLRDIHQD | PDVVMVGEIR | DGETATIPVQ | ASTLGHVLS |
| <i>R. amer</i> | 175 | ILCALCQR-- | TDSYSLDEP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | QVAGQSRSH | ETANALRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| <i>A. godo</i> | 106 | ILGLDQGR-- | PMQITLDEP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | KFACGRPTDE | SMATEIRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| <i>N. grub</i> | 200 | ILCEMSSE-- | KADATYSLDP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | EQGQKRSLSA | ETANALRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| <i>N. fowl</i> | 267 | ILCEMSSE-- | KADATYSLDP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | EQGQKRSLSA | ETANALRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| <i>N. dama</i> | 115 | ILCALCQR-- | TDSYSLDEP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | EQGQKRSLSA | ETANALRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| <i>M. jako</i> | 119 | ILCALCQR-- | TDSYSLDEP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | EQGQKRSLSA | ETANALRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| <i>M. 249</i> | 116 | ILCALCQR-- | TDSYSLDEP | VEMLNTHGI | EVVQIDMFC | EQGQKRSLSA | ETANALRHD | PDIVYFGEIR | NKDDFETATS | IALLSGAVIS |
| | | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |
| <i>E. coli</i> | 351 | TLTINAVGA | ITRIQDYGVE | PFLSSSLTG | VMAQLRRTF | CHDSQAPAPA | T---DEEERF | LGITDARIVT | YVHFQCCPAC | NHKGFGRGA |
| <i>K. oxyt</i> | 348 | TLTINAVGA | ITRIQDYGVE | PFLSSSLTG | VMAQLRRTF | CHDSQAPAPA | N---ADTARQ | MEIAPG--TA | LWQPRGCAEC | GFTGYFGRIG |
| <i>R. amer</i> | 264 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| <i>A. godo</i> | 196 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| <i>N. grub</i> | 289 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| <i>N. fowl</i> | 356 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| <i>N. dama</i> | 204 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| <i>M. jako</i> | 208 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| <i>M. 249</i> | 205 | TGHASPDOL | LERIRSMNID | DKTQFRAFRC | IGVKKRPVIL | CHCKGRMVI | Y-GRIDNRAI | KULTYRUVIT | TEKVNARREV | PVVCMEPEPS |
| | | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | | |
| <i>E. coli</i> | 438 | IHELIVUDT | LRDLIRQAG | ELPERYVVR | --QHSAGIRS | --NGIEKVID | GETSLDEILR | VIMPA | | |
| <i>K. oxyt</i> | 433 | IHELLLVDR | VRMAIRGEN | EVTYIQQLG | --TDYVLRH-- | --AGRPKADA | GITSWCEILR | VSEQQIAEAS | | |
| <i>R. amer</i> | 353 | INCS---- | TGGYTHNHTI | VEPIRHHET | --DTLPSLRAN | HTYITEETLL | DLIMQGVNPF | LYLESLL | | |
| <i>A. godo</i> | 286 | DIGN--CSPC | TNGVAGNYTI | VEPIRHHET | --DDPFLRSR | HTYITEEPHM | DLILRGDVP | MYLESVL | | |
| <i>N. grub</i> | 378 | NSGGQTCPC | VNGVISNHTI | VEPIRHHET | --SDMETLRKK | HTYITEETLL | SLIMQGVNPF | MYLQNSV | | |
| <i>N. fowl</i> | 445 | KNADTCPC | VNGVISNHTI | VEPIRHHET | --SDMETLRKK | HTYITEETLL | SLIMQGVNPF | LYLQNSIH | | |
| <i>N. dama</i> | 293 | SEH--CPC | VNGVISNHTI | VEPIRHHET | --SDMETLRKK | HTYITEETLL | SLIMQGVNPF | LYLESVL | | |
| <i>M. jako</i> | 297 | TVHC---- | NGGYTHNHTI | VEPIRHHET | --DDPFLRSR | HTYITEETLL | FLIMQGVNPF | LYLENFL | | |
| <i>M. 249</i> | 294 | SVHC---- | NGGYTHNHTI | VEPIRHHET | --DTLPSLRAN | HTYITEETLL | SLIMQGVNPF | LYLENFL | | |

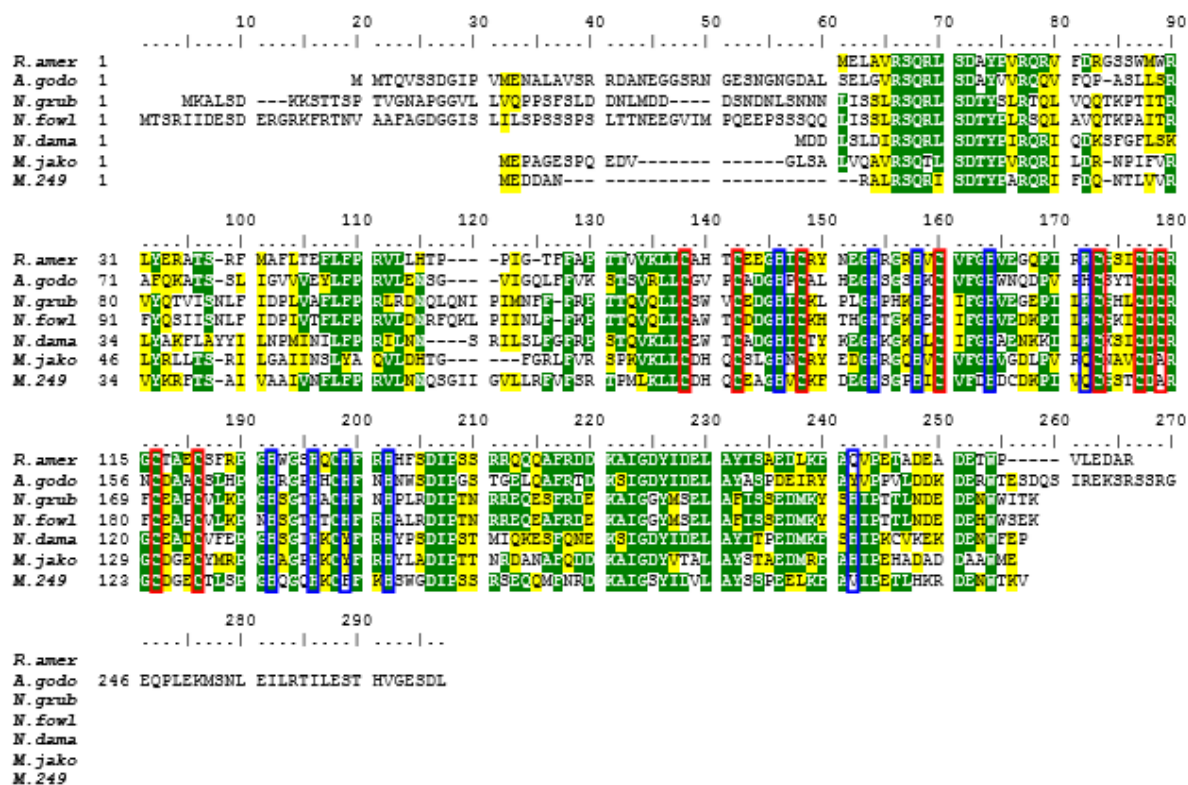
Obrázek 14: Alignment GspE. U *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 podtrženy MTS. MTS byly určeny pomocí alignmentu s bakteriálními organismy a predikčních programů: TargetP, MitoProt, PSORT II, viz 5.1.3. Mitochondriální presekvenční. V rámečcích vyznačeny ATPázové motivy: červeně – Walker A motiv, modře – Asp boxy, oranžově – His box, fialově - Walker B motiv.

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|----------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| | | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| <i>E. coli</i> | | | | | | | | | | |
| <i>K. oxyt</i> | | | | | | | | | | |
| <i>R. amer</i> | 1 | | | | | | | | MPFA | RGDEASTGA |
| <i>A. godo</i> | | | | | | | | | | |
| <i>N. grub</i> | 1 | | MLSPQH | ISRMRIADH | LFPKNNTTTI | QCDDDNKQHG | QTSGQTMNEN | NKQKTKSLKL | ILQYLLNNNL | LLKGVGQFVS |
| <i>N. fowl</i> | 1 | M (AK) ₂₃ | HHFNHC | DKTSRESSKS | TWSTLSSVLK | YLLNSHLLFR | ACEIDSEKHF | KIQDANDKNT | NTPEDTISKI | HHHDSIIGNT |
| <i>N. dama</i> | 1 | | | | | | | | MNDETTK | KISNRRLKIL |
| <i>M. jako</i> | | | | | | | | | | |
| <i>M. 249</i> | 1 | | | | | | | | M | LGSGRAYKRV |
| | | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| <i>E. coli</i> | 1 | | MAL | FYYQALERNG | RKTGKMIEAD | SARHARQLLR | GKDLIFVHIE | ARMNALAGEL | IQRRRHARR | VBAAALALFT |
| <i>K. oxyt</i> | 1 | | MAL | FRYQAVDENG | KTRRGVQQAD | SARHARQLLR | EKGWALALDIA | P--RAGSGSQ | DR----FIRR | TNARDLALVT |
| <i>R. amer</i> | 15 | RPRRRVRALL | QHVFFRVLLAV | AQAASSSTES | REVQRRGHVE | TEIEAAPREL | DGFSASWLSH | IURSLQGSSE | LS----ALST | QAFNNILFLV |
| <i>A. godo</i> | 1 | MASR | GSVHLRRVYR | LVRHLNVPSV | GQAPSMTGAS | SSIDHDQIAD | SRSSSSSLWA | IURSVHCKGA | LS----DESL | QAFNNILFLV |
| <i>N. grub</i> | 77 | DHDQYVIAEE | NIAIFEKQW | IENSQTAGKT | EAKPITAGKK | KMSDDKSKSD | FTSHPGLLNA | LIRSFQGNSS | LS----TDSL | QAFNNILFLV |
| <i>N. fowl</i> | 151 | NKLFVHHFAD | DEKKGLVTAA | GRTSSNSPKH | ANNTATTTTA | TFVATTSRSD | FTSHPGLLNA | FIRSFQGNPP | LS----TDSL | QAFNNILFLV |
| <i>N. dama</i> | 18 | TQQISFINKQ | KNNQKNDTKK | PTKSPLSTIS | FILNWFLLSPQ | KKVMDIVKFA | RQSKPNLLDA | ILKSFHGGST | LS----TAST | QAFNNILFLV |
| <i>M. jako</i> | 1 | | MADK | RAIERLKRIM | DOMQFRLSA | ITPHLAQSAT | GR-QVNFTYA | VIRSLQGSSE | LS----SRSL | QAFNNILFLV |
| <i>M. 249</i> | 12 | QQLLSHVQGA | TRHIDASPIT | PGALAHSLIS | VRADSDQRAV | EHAATAITAS | RQSKPSLLMA | IURVFOGSKE | LS----AAL | MCQNNILFLV |
| | | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 |
| <i>E. coli</i> | 74 | ROLATLVQAA | MPLSTQDAV | SECEKMKHVK | SLGMALSRRI | QEG--YTLSD | STREHFAVFD | SLFCAMVARG | EKSGHLDGVL | NRIADYTEQR |
| <i>K. oxyt</i> | 68 | ROLATLVQAA | IPLEKPLDAV | AQCEKMKHVK | TLTAGVSGKV | LEG--HSLAE | AMRGYPGCFD | ALFCAMVARG | EKSGHLDGVL | NRIADYTEQR |
| <i>R. amer</i> | 101 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| <i>A. godo</i> | 81 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| <i>N. grub</i> | 163 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| <i>N. fowl</i> | 237 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| <i>N. dama</i> | 104 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| <i>M. jako</i> | 70 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| <i>M. 249</i> | 98 | NSIPPSDNL | SIFIMILRSS | FTDSDLLPFL | ACWKIPRNSL | GGDYKTFTT | TLSEVQCYLE | SWYSSSLVLG | RALGSEFDEL | LYCAQRFARE |
| | | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| <i>E. coli</i> | 162 | QRLKSRLLQ | MIYELVLLV | ATGVVTLALT | AVVKKIRIQF | DHGHGHALFS | TRMLIAMSDA | LQASGVYVDA | GDLGLVLGQ | RULKNFAMRI |
| <i>K. oxyt</i> | 156 | QQLRARLLQ | MIYELVLLV | AVSVVTLALT | TVVKKIRIQF | IHLKQALFS | TRMLIAMSDV | LQASGVYVDA | GDLGLVLGQ | RULKNFAMRI |
| <i>R. amer</i> | 191 | INTRAQAVVSA | DIYPADMTL | SIIGGTTLLA | RILPQCHTPE | ESMGLVEVAF | DTAVVTLQQR | TELF--SVSLA | VLPFSALSSR | LLPFRTHMAL |
| <i>A. godo</i> | 171 | IRLRNELYSS | DIYPADMTL | SIIGGTTLLA | RILPQCHTPE | ESMGLVEVAF | DTAVVTLQQR | TELF--SVSLA | VLPFSALSSR | LLPFRTHMAL |
| <i>N. grub</i> | 253 | IKVQKAITGE | DIYPADMTL | SIIGGTTLLA | RILPQCHTPE | ESMGLVEVAF | DTAVVTLQQR | TELF--SVSLA | VLPFSALSSR | LLPFRTHMAL |
| <i>N. fowl</i> | 427 | IKVQKAITGE | DIYPADMTL | SIIGGTTLLA | RILPQCHTPE | ESMGLVEVAF | DTAVVTLQQR | TELF--SVSLA | VLPFSALSSR | LLPFRTHMAL |
| <i>N. dama</i> | 194 | IKVQKAITGE | DIYPADMTL | SIIGGTTLLA | RILPQCHTPE | ESMGLVEVAF | DTAVVTLQQR | TELF--SVSLA | VLPFSALSSR | LLPFRTHMAL |
| <i>M. jako</i> | 160 | IRISASITGG | DIYPADMTL | SIIGGTTLLA | RILPQCHTPE | ESMGLVEVAF | DTAVVTLQQR | TELF--SVSLA | VLPFSALSSR | LLPFRTHMAL |
| <i>M. 249</i> | 188 | VQINARFRST | DIYEVVLLV | GVVVLTLLSK | VVIRPQVQGM | EQSGQPVQGF | IQFAMRMTHF | FSYH--APALA | ILHPSLSLQ | YLPFRTHMAL |
| | | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 |
| <i>E. coli</i> | 252 | RWDRTILLRP | VTGRVARGLN | TARFSTRTSI | LTASSVPLTE | GIQTAAVSA | NRYVEQQLL | SDRVREGSS | DRADADLRL | FPPMIMYMTA |
| <i>K. oxyt</i> | 246 | AWHRLILLRP | LIGRVARSVN | SARYARTDSI | LNASVPLLL | AMRISAEVLS | NARAKRQLER | SDRVREGVS | LHCAEMTQL | FPPMIMYMTA |
| <i>R. amer</i> | 280 | OYIKRHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| <i>A. godo</i> | 260 | HMLRHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| <i>N. grub</i> | 342 | OYIKRHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| <i>N. fowl</i> | 516 | OYIKRHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| <i>N. dama</i> | 282 | OYIKRHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| <i>M. jako</i> | 249 | EVIRKHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| <i>M. 249</i> | 277 | OYIKRHTPLG | RIFLEDKAT | LILVLSLLDR | ECMTSKLLLV | CSLISNPFVL | QHMVESMAAR | AKYCGASSEV | LMMITQKHV | FSPYEIAYLQ |
| | | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | | |
| <i>E. coli</i> | 342 | SGEQSGE--- | LETMLQAAV | NQREFFDTQV | GLAUGLFBFA | LVQAMAGVVL | FIVVIALEP | QQLNNMGM | | |
| <i>K. oxyt</i> | 336 | SGEQSGE--- | LETMLQAAV | NQREFFDTQV | GLAUGLFBFA | LVQAMAGVVL | FIVVIALEP | QQLNNMGM | | |
| <i>R. amer</i> | 370 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |
| <i>A. godo</i> | 350 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |
| <i>N. grub</i> | 432 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |
| <i>N. fowl</i> | 606 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |
| <i>N. dama</i> | 373 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |
| <i>M. jako</i> | 339 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |
| <i>M. 249</i> | 367 | ACFLTGKHA | VODGLRYVSG | AWTQCYVARV | KRMGLGICER | QVAILGIVVL | VIRALGIVPL | IELTSSVSTT | | |

Obrázek 15: Alignment GspF. U *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 podtrženy MTS. MTS byly určeny pomocí alignmentu s bakteriálními organismy a predikčních programů: TargetP, MitoProt, PSORT II, viz 5.1.3. Mitochondriální presekvenční. Ve fialových rámečcích zvýrazněny 3 TMDs na základě predikčního programu TMHMM.



Obrázek 16: Alignment GspG. U *N. gruberi* a *M. sp. str. 249* podtrženy MTS. MTS byly určeny pomocí alignmentu s bakteriálními organismy a predikčních programů: TargetP, MitoProt, PSORT II, viz 5.1.3. Mitochondriální presekvence. Červená šipka ukazuje procesující místo prepilin peptidázy. Motiv pro prepilin peptidázy chybí u eukaryotických zástupců, což ukazuje na odlišné procesování proteinu. Ve fialovém rámečku zvýrazněna TMD na základě predikčního programu TMHMM.

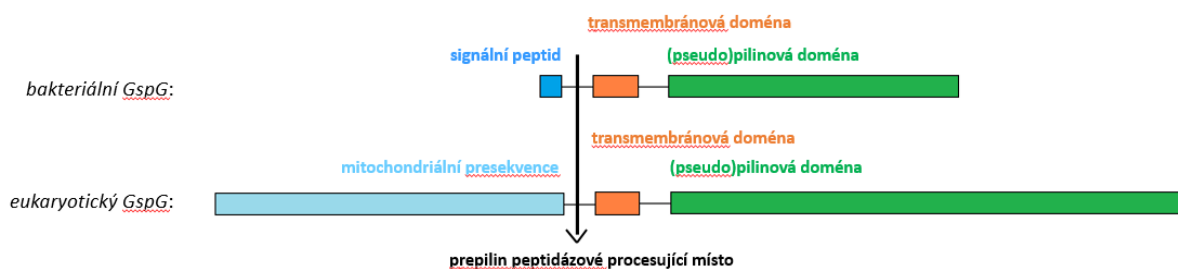


Obrázek 17: Alignment potenciálního substrátu GspZ. Hlavními důvody pro jeho substrátovou funkci byly (i) ko-evoluce s podjednotkami T2SS u eukaryot a (ii) konzervované funkční aminokyselinové zbytky. V červených rámečcích zvýrazněny konzervované cysteiny, v modrých rámečcích zvýrazněny konzervované histidiny. Proteiny vázící hemy nebo FeS centra jsou častými substráty T2SS.

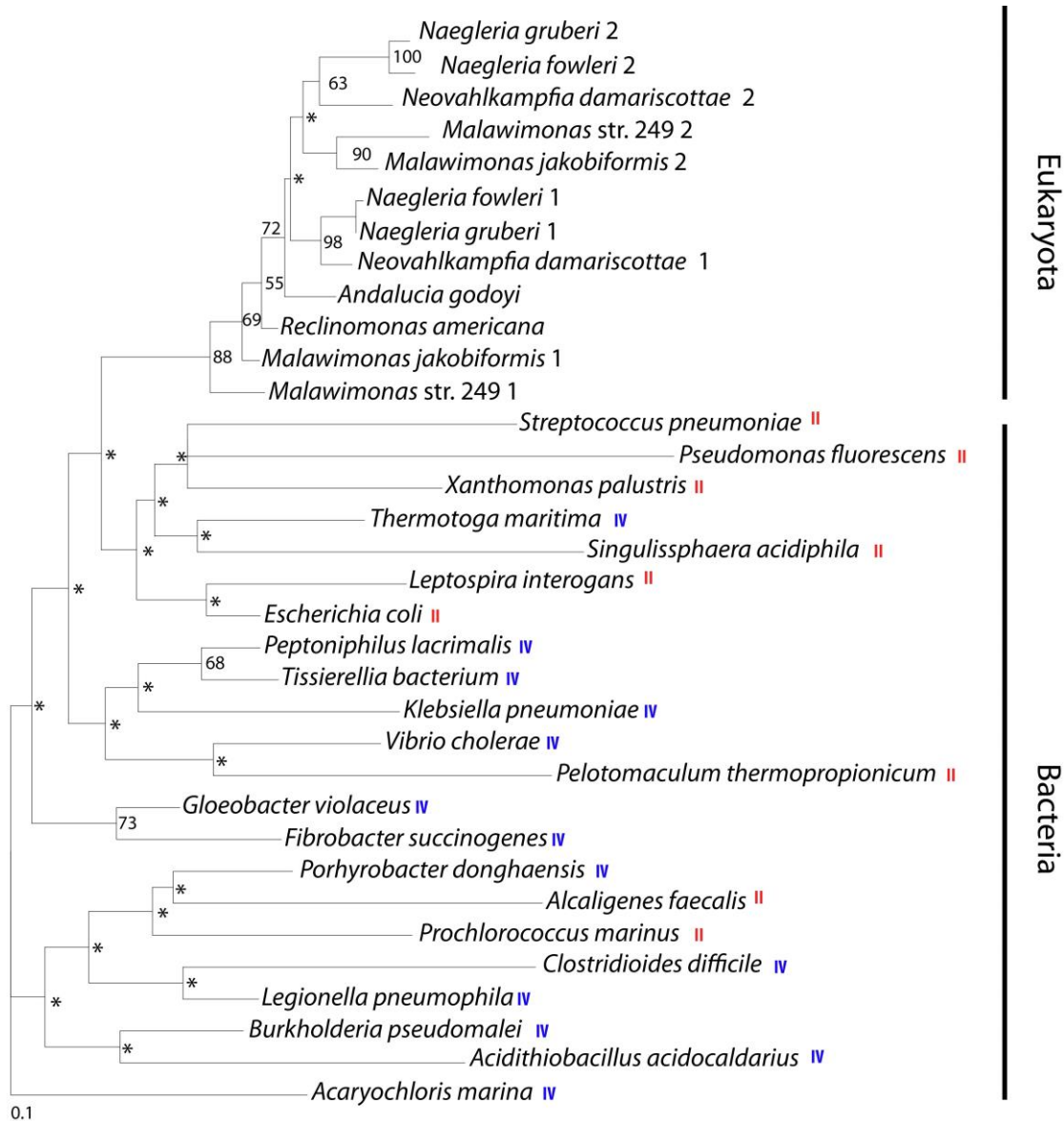
5.1.2. Analýza GspG

Hlavní pseudopilinové podjednotky bakteriálních i eukaryotických T2SS mají krátký cca 25 - 30 aminokyselin dlouhý hydrofobní úsek (predikční program TMHMM), který je kotví ve vnitřní mitochondriální membráně. Tomuto transmembránovému úseku předchází prepilin peptidázové procesující místo a následuje (pseudo)pilinová doména (Obr. 18). Absence prepilin peptidázového motivu v eukaryotických GspG ukazuje na odlišný způsob procesování a transportu proteinu. Namísto signálního peptidu u bakteriálních proteinů je u eukaryot přítomna velice dlouhá (až 260 aminokyselin u *N. fowleri*) nehomologická sekvence, jež pravděpodobně obsahuje MTS (viz níže).

Evoluce pilinů a pseudopilinů je příliš složitá, abychom dokázali objasnit vztahy mezi jednotlivými skupinami bakterií. Naše předběžné analýzy ukazují, že zatímco nejsme schopni rozlišit původ eukaryotického T2SS, předpokládáme, že tento systém je monofyletický, tzn. že všichni eukaryotičtí zástupci ho zdědili od jednoho společného předka (Obr. 19).



Obrázek 18: Srovnání bakteriálního a eukaryotického GspG.



Obrázek 19: Fylogenetická analýza pilinů a pseudopilinů. Alignment byl vytvořen pomocí ClustalW, který je součástí programu BioEdit, poté manuálně editován a použit (146 pozic) pro fylogenetickou analýzu pomocí PhyML. * - hodnoty bootstrapu pod 50, II – pseudopilin T2SS, IV – pilin T4PS

5.1.3. Mitochondriální presekvence Gsp proteinů

Ke studiu interakcí mezi proteiny pomocí Y2H bylo třeba odstranit MTS. Vytvoření fúzního proteinu obsahujícího na N-konci doménu transkripčního faktoru totiž znemožňuje odštěpení MTS. V proteinové sekvenci byla u GspE, GspF a GspG (proteiny směřující do vnitřní membrány mitochondrie) určena MTS (Tab. 3) kombinací několika technik: predikční programy TargetP, MitoProt, PSORT II; alignment příbuzných a bakteriálních organismů.

Tabulka 3: Přehled proteinů, u kterých byla zkrácena MTS.

| název proteinu | původní velikost | konec presekvence | velikost bez presekvence |
|----------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
| NgGspE | 442 bp | IGF ¹²⁹ PAT | 314 bp |
| NgGspF | 502 bp | DPT ¹²⁹ SHP | 374 bp |
| NgGspG | 394 bp | IHH ¹⁶⁴ LSM | 231 bp |
| M249GspE | 1062 bp | RAG ¹¹⁸ VAL | 945 bp |
| M249GspF | 1317 bp | TAS ¹⁸¹ RQS | 1137 bp |
| M249GspG1 | 828 bp | LLA ²⁹⁸ RLA | 531 bp |
| M249GspG2 | 924 bp | MYP ³²⁸ RKL | 603 bp |

5.2. *Naegleria gruberi*

5.2.1. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí Y2H

Po úspěšném zaklonování Gsp genů (NgGspD, bez MTS: NgGspE, NgGspF, NgGspG) do Y2H plazmidů pGADT7 a pGBKT7 byly kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109 kotransformovány vybranými dvojicemi rekombinantních plazmidů (Tab. 4). Jako negativní kontrola byl rekombinantní plazmid každého NgGsp genu jednou kotransformován s prázdným plazmidem.

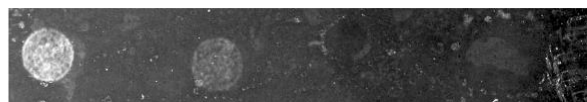
Tabulka 4: Vybrané dvojice rekombinantních plazmidů s Gsp geny *N. gruberi*, kterými byly kotransformovány kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109.

| pGBKT7 | pGADT7 |
|---------------|---------------|
| <i>NgGspD</i> | prázdný |
| <i>NgGspD</i> | <i>NgGspD</i> |
| <i>NgGspD</i> | <i>NgGspG</i> |
| <i>NgGspE</i> | prázdný |
| <i>NgGspE</i> | <i>NgGspE</i> |
| <i>NgGspE</i> | <i>NgGspF</i> |

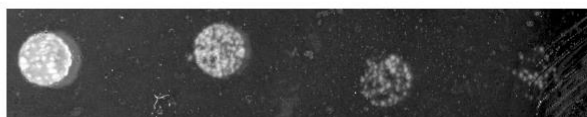
| pGBKT7 | pGADT7 |
|---------------|---------------|
| <i>NgGspF</i> | prázdný |
| <i>NgGspF</i> | <i>NgGspF</i> |
| <i>NgGspF</i> | <i>NgGspG</i> |
| <i>NgGspG</i> | prázdný |
| <i>NgGspG</i> | <i>NgGspD</i> |
| <i>NgGspG</i> | <i>NgGspF</i> |
| <i>NgGspG</i> | <i>NgGspG</i> |

Kotransformované kvasinky byly vysety na plotnu SD -TRP/-LEU pro ověření, že buňky byly transformovány oběma plazmidy a na plotnu SD -TRP/-LEU/-HIS pro průkaz interakce. Dále byly kvasinky rozkapány do ředící řady na plotnu SD-TRP/-LEU/-HIS. Pouze interakce mezi *NgGspG* a *NgGspD* byla pozitivní (Obr. 20). Bohužel, jak bylo později zjištěno, byl gen *NgGspD* kratší na N-konci, kvůli špatné anotaci genomu.

pGBKT7_*NgGspG* + pGADT7



pGBKT7_*NgGspG* + pGADT7_*NgGspD*

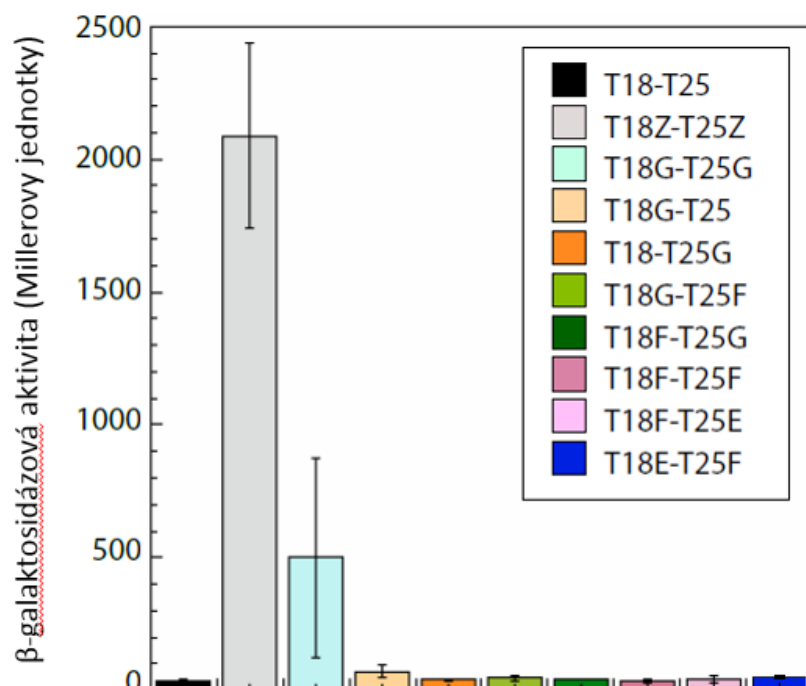


Obrázek 20: Rozkapání (serial dilution test) transformovaných kvasinek do ředící řady. Pozitivní interakce pouze mezi *NgGspG* a *NgGspD* (bez N-konce). Jako negativní kontrola byl použit pGBKT7 se zaklonovaným *NgGspG* a prázdný pGADT7.

5.2.2. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí BACTH

Nejdříve byly zaklonovány *NgGsp* geny do BACTH plazmidů pUT18c a pKT25. Dále byly vybranými dvojicemi transformovány bakterie *E. coli* kmene DHT1. Po úspěšné transformaci byla stanovena β -galaktosidázová aktivita (výpočet Millerových jednotek). Jako negativní kontrola byla použita transformace prázdnými plazmidy pUT18c a pKT25, také rekombinantní plazmid pKT25 s *NgGsp* genem byl vždy transformován s prázdným plazmidem pUT18c. Jako pozitivní kontrola byly použity rekombinantní plazmidy s motivem leucinového zipu (pKT25_Zip + pUT18c_Zip).

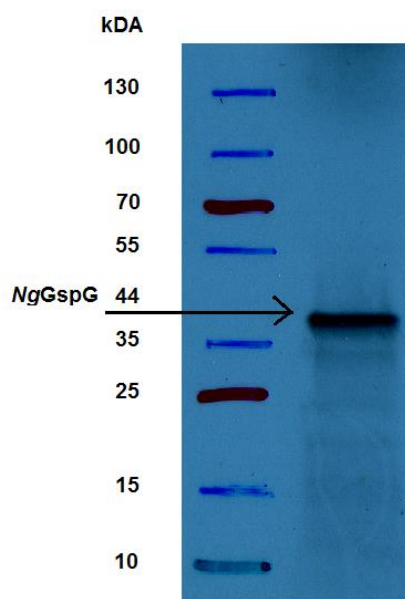
BACTH metodu u *NgGsp* genů provedla Mgr. Lenka Horváthová, Ph.D. Byla detekována interakce mezi *NgGspG* a *NgGspG* (Graf 1).



Graf 1: Výsledky měření β -galaktosidázové aktivity (výpočet Millerových jednotek) *NgGsp*. První sloupec (černý) představuje negativní kontrolu: prázdné plazmidy pUT18c-pKT25 (T18-T25), druhý sloupec (šedý) je pozitivní kontrola: pUT18c_Zip-pKT25_Zip (T18Z-T25Z), třetí sloupec (světle modrý) je prokázaná interakce mezi *NgGspG*: pUT18c_ *NgGspG*-pKT25_ *NgGspG* (T18G-T25G), čtvrtý a pátý sloupec (světle a tmavě oranžový) jsou negativní kontroly pro *NgGspG*: pUT18c_ *NgGspG*-pKT25 (T18G-T25) a pUT18c-pKT25_ *NgGspG* (T18-T25G). Ostatní barevné sloupce jsou neprokázané interakce mezi *NgGspG*, *NgGspF* a *NgGspE*.

5.2.3. Import *NgGspG* do mitochondrií

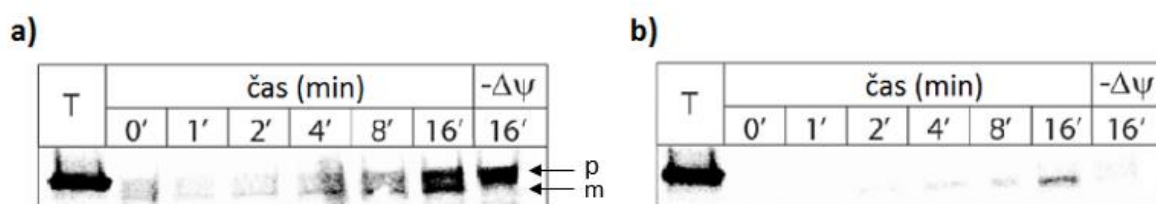
Z důvodu analýzy mitochondriálního targetování *NgGspG* byly zahájeny *in vitro* importní studie. *NgGspG* gen byl nejprve zaklonován do kontrolního DHFR plazmidu, DHFR gen byl zaměněn za *NgGspG* gen. Do dalšího kontrolního DHFR plazmidu byla zaklonován chimerický gen Su9 (podjednotka 9 kvasinkové ATPázy) s myší DHFR. Tyto rekombinantní plazmidy byly použity do *in vitro* translačních reakcí. Tato metoda nebyla v naší laboratoři zavedena a výsledná správnost i množství proteinu bylo nečekaným úspěchem (Obr. 21).



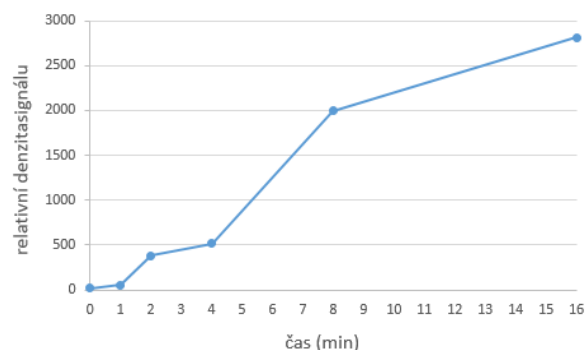
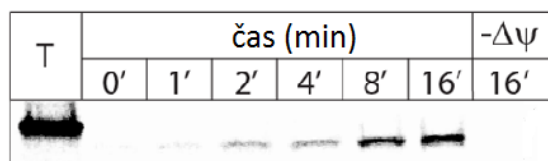
Obrázek 21: Kontrola výsledku translační reakce. 0,5 μ l reakce bylo nanášeno a analyzováno pomocí SDS-PAGE. Gel byl poté vysušen a radioaktivita byla detekována na film, který byl exponován přes noc a vyvolán.

Po úspěšné translaci NgGspG byly izolovány mitochondrie kvasinek *S. cerevisiae* kmene YPH499.

Importní pokusy byly navrženy tak, aby se mj. zjistila potřeba membránového potenciálu ($\Delta\Psi$) pro import do vnitřní mitochondriální membrány. Nejdříve byl optimalizován import pozitivní kontroly Su9 (Obr. 22, 23). Na jednotlivých importech je vidět malý posun importovaných „bandů“, který odpovídá procesování kvasinkové Su9.

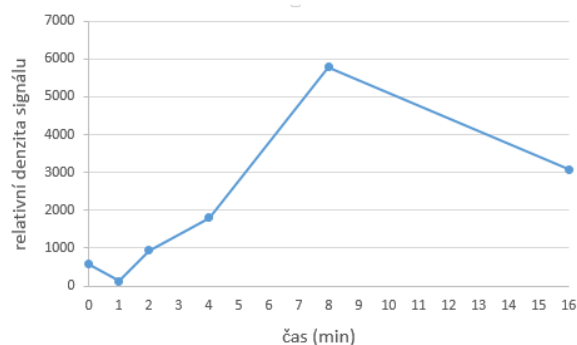
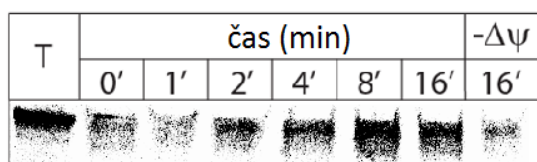


Obrázek 22: Příklady optimalizace importů Su9 do mitochondrií kvasinek YPH499. a) Velké množství proteinu a málo proteinázy K. b) Místo proteinázy K použit trypsin (2 μ l trypsinu (10 mg/ml)) a místo PMSF použito TPI (20 μ l TPI (20 mg/ml)). $\Delta\Psi$ - membránový potenciál, p – prekurzor, m – maturovaný (procesovaný) protein



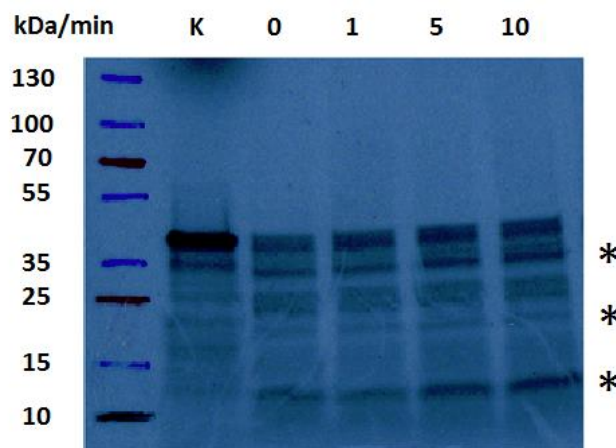
Obrázek 23: Import a graf importu Su9 do mitochondrií kvasinek (YPH499). $\Delta\Psi$ - membránový potenciál

Následně byl proveden import NgGspG do kvasinkových mitochondrií (Obr. 24). Importy bylo třeba optimalizovat, ale pozitivní kontrola i studovaný NgGspG se úspěšně importovaly. Byla prokázána potřeba membránového potenciálu k importu a vlastní import obou proteinů do mitochondrií. Koncový úbytek proteinu NgGspG může být způsoben možnou degradací v nespecifickém heterologním buněčném systému. Navíc nebylo pozorováno předpokládané odštěpení MTS.



Obrázek 24: Import a graf importu NgGspG do mitochondrií kvasinek (YPH499). $\Delta\Psi$ - membránový potenciál

Poté byly izolovány mitochondrie *N. gruberi*. A následně byl do nich proveden import NgGspG (Obr. 25). Na rozdíl od mitochondrií *S. cerevisiae* došlo během importu k procesování. Jestli je ovšem procesování specifické bude třeba dále otestovat.



Obrázek 25: Import NgGspG do mitochondrií *N. gruberi*. „Bandy“ s hvězdičkou jsou kandidáti pro procesování NgGspG.

5.3. *Malawimonas* sp. str. 249

Pro studium interakcí eukaryotických Gsp proteinů byly vybrány i geny *Malawimonas* sp. str. 249. Hlavními důvody pro tento záměr byly: (i) vysoká kvalita zjištěné genomové sekvence a následné genové predikce (publikovaný genom *N. gruberi* obsahuje řadu chybějících úseků), (ii) relativně krátké MTS a (iii) vyšší podobnost s bakteriálními Gsp proteiny zjištěná vzájemným porovnáváním jednotlivých homologů.

5.3.1. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí Y2H

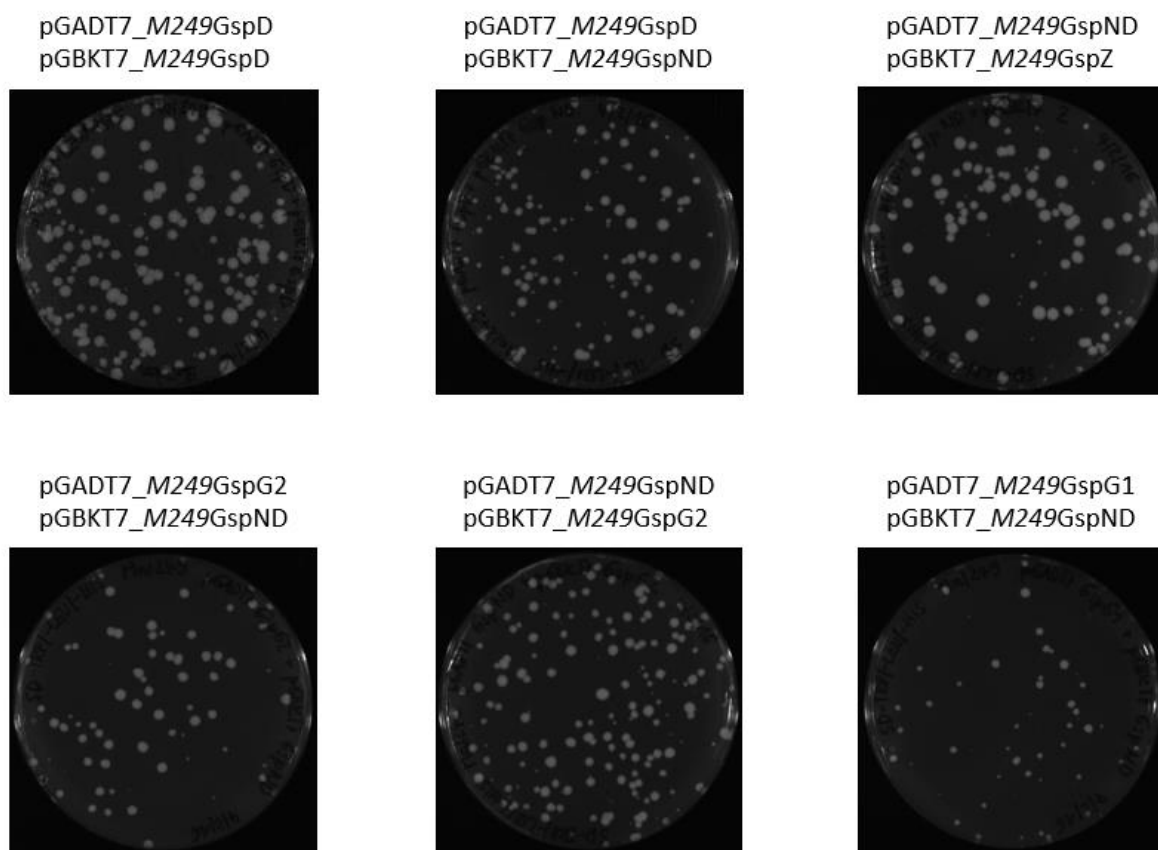
Po úspěšném zaklonování Gsp genů (*M249GspD*, *M249GspND*, *M249GspZ*, bez MTS: *M249GspE*, *M249GspF*, *M249GspG1*, *M249GspG2*) do Y2H plazmidů pGADT7 a pGBKT7 byly kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109 kotransformovány vybranými dvojicemi rekombinantních plazmidů (Tab. 5). Jako negativní kontrola byla použita dvojice prázdných plazmidů pGADT7 a pGBKT7.

Tabulka 5: Vybrané dvojice rekombinantních plazmidů s Gsp geny *M. sp.* str. 249, kterými byly kotransformovány kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109.

| pGADT7 | pGBKT7 |
|------------------|------------------|
| prázdný | prázdný |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspZ</i> |
| <i>M249GspE</i> | <i>M249GspE</i> |
| <i>M249GspE</i> | <i>M249GspF</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspE</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspF</i> |

| pGADT7 | pGBKT7 |
|------------------|------------------|
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspZ</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspF</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspZ</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspF</i> |
| <i>M249GspZ</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspZ</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspZ</i> | <i>M249GspG2</i> |

Kotransformované kvasinky byly vysety na plotnu SD -TRP/-LEU pro ověření, že buňky byly transformovány oběma plazmidy a na plotnu SD -TRP/-LEU/-HIS pro průkaz interakce. Některé kotransformanty, které více porostly plotny SD -TRP/-LEU/-HIS (Obr. 26), byly testovány dále. Kvasinky byly rozkapány do ředící řady na plotnu SD-TRP/-LEU/-HIS. Z šesti dříve narostlých kotransformantů, však byla spolehlivě potvrzena pouze interakce mezi dvěma GspD, slaběji pak vyšly interakce mezi GspD a GspND (N-koncová mezimembránová část GspD) a mezi GspND a potenciálním substrátem GspZ (Obr. 27).



Obrázek 26: Vybrané kvasinkové kotransformace, které více porostly plotny SD-TRP/-LEU/-HIS. Tři možné interakce (*M249GspD*+*M249GspD*, *M249GspD*+*M249GspND*, *M249GspND*+*M249GspZ*) potvrzeny po následném ředícím růstovém testu (Obr. 27). Jediná kotransformace narostlá v obou kombinacích plazmidů (*M249GspG2*+*M249GspND*) nebyla potvrzena, stejně jako z této sady nejméně narostlá plotna s kotransformací *M249GspG1*+*M249GspND*.

pGADT7 + pGBKT7



pGADT7_M249GspD + pGBKT7_M249GspD



pGADT7_M249GspD + pGBKT7_M249GspND



pGADT7_M249GspND + pGBKT7_M249GspZ



Obrázek 27: Rozkapání (serial dilution test) transformovaných kvasinek do ředící řady. Pozitivní interakce mezi *M249GspD* a *M249GspD*, slaběji pak mezi *M249GspD* a *M249GspND* a mezi *M249GspND* a potenciálním substrátem *M249GspZ*. Jako negativní kontrola byly použity kvasinky s prázdnými plazmidy pGBKT7 a pGADT7.

5.3.2. Interakce mezi Gsp proteiny pomocí BACTH

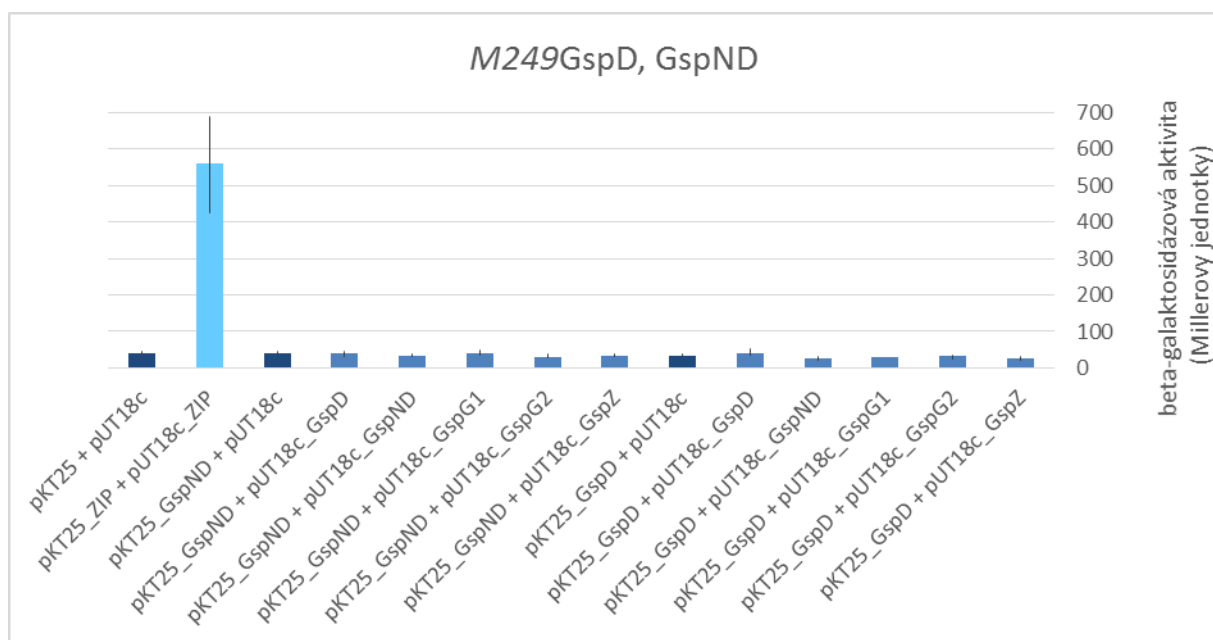
Geny *M249Gsp* byly zaklonovány do BACTH plazmidů pUT18c a pKT25. Dále byly vybranými dvojicemi (Tab. 6), transformovány bakterie *E. coli* kmene DHT1. Po úspěšné transformaci byla stanovena β -galaktosidázová aktivita (výpočet Millerových jednotek). Jako negativní kontrola byla použita transformace prázdnými plazmidy pUT18c a pKT25, také rekombinantní plazmid pKT25 s *M249Gsp* genem byl vždy transformován s prázdným plazmidem pUT18c. Jako pozitivní kontrola byly použity rekombinantní plazmidy s motivem leucinového zipu (pKT25_Zip + pUT18c_Zip).

V naší laboratoři se nepodařilo prokázat žádnou z testovaných interakcí (Graf 2, 3, 4). I pozitivní kontroly nedosahovaly tak vysokých hodnot jako je obvyklé. Proto byly rekombinantní plazmidy poslány do laboratoře Makromolekulárních systémů a signalizace (Institut Pasteur, Paris), kde je BACTH metoda zavedená. Tam se povedlo potvrdit interakce mezi GspG1 a GspG1, také byly detekovány interakce mezi GspE a GspE a mezi GspG2 a GspF (Graf 5), které nebyly mezi původními námi testovanými. V současnosti pracujeme na reanalýze výsledků.

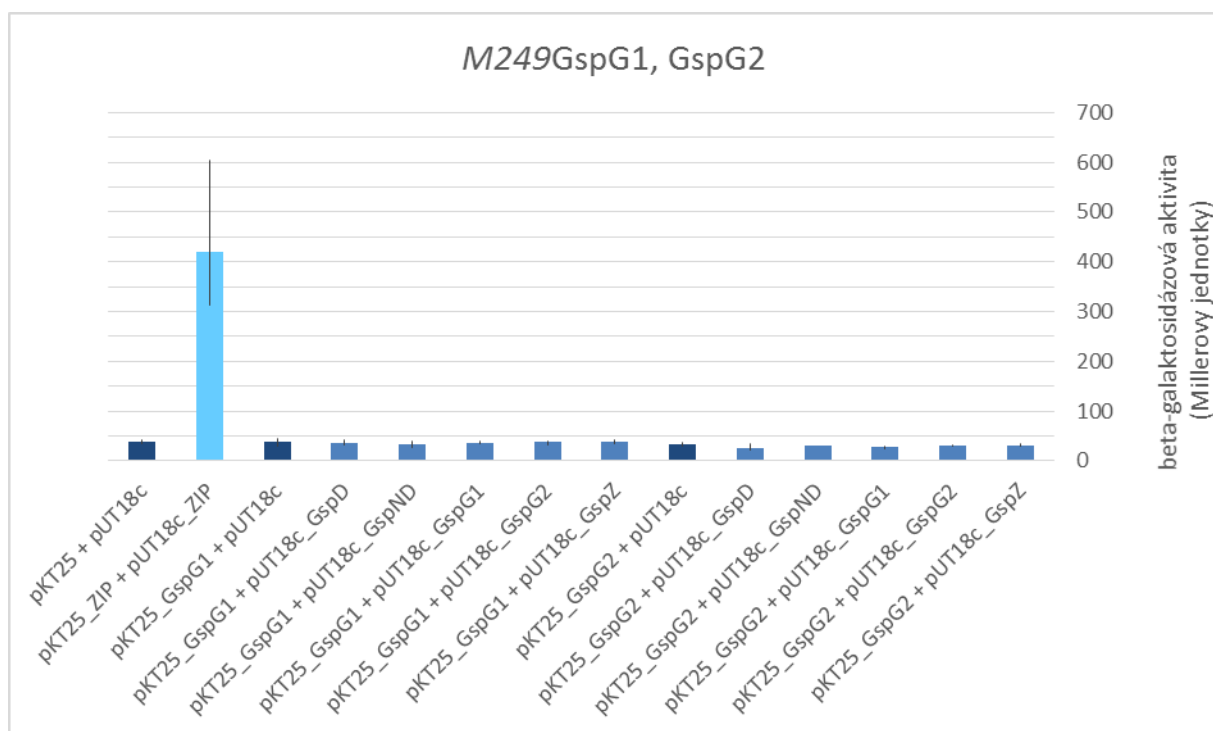
Tabulka 6: Vybrané dvojice rekombinantních plazmidů s Gsp geny *M. sp.* str. 249, kterými byly kotransformovány bakterie *E. coli* kmene DHT1.

| pGADT7 | pGBKT7 |
|------------------|------------------|
| prázdný | prázdný |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspD</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspND</i> | <i>M249GspZ</i> |
| <i>M249GspE</i> | <i>M249GspE</i> |
| <i>M249GspE</i> | <i>M249GspF</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspE</i> |
| <i>M249GspF</i> | <i>M249GspF</i> |

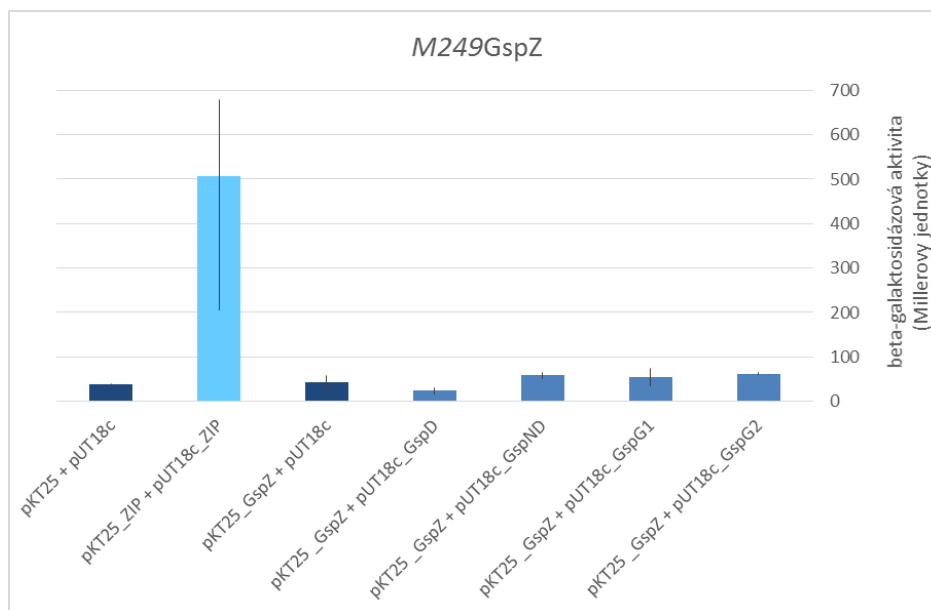
| pGADT7 | pGBKT7 |
|------------------|------------------|
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspZ</i> |
| <i>M249GspG1</i> | <i>M249GspF</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspD</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspG2</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspZ</i> |
| <i>M249GspG2</i> | <i>M249GspF</i> |
| <i>M249GspZ</i> | <i>M249GspND</i> |
| <i>M249GspZ</i> | <i>M249GspG1</i> |
| <i>M249GspZ</i> | <i>M249GspG2</i> |



Graf 2: Výsledky β -galaktosidázové aktivity při testovaných interakcích M249GspND, GspD.

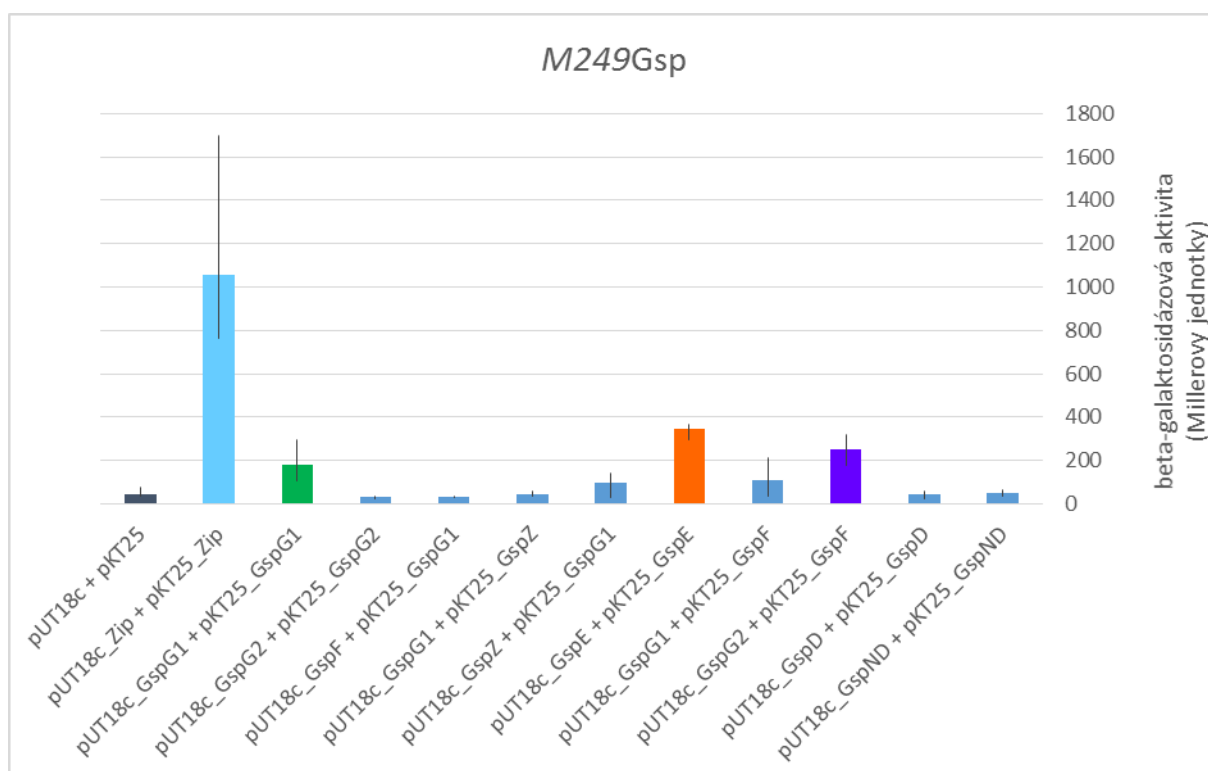


Graf 3: Výsledky β -galaktosidázové aktivity při testovaných interakcích M249GspG1, GspG2.



Graf 4: Výsledky β -galaktosidázové aktivity při testovaných interakcích *M249GspZ*.

Grafy 2-4: Tmavě modré sloupce představují negativní kontroly. Světle modré sloupce reprezentují pozitivní kontroly. Ostatní modré sloupce jsou negativní testované interakce.



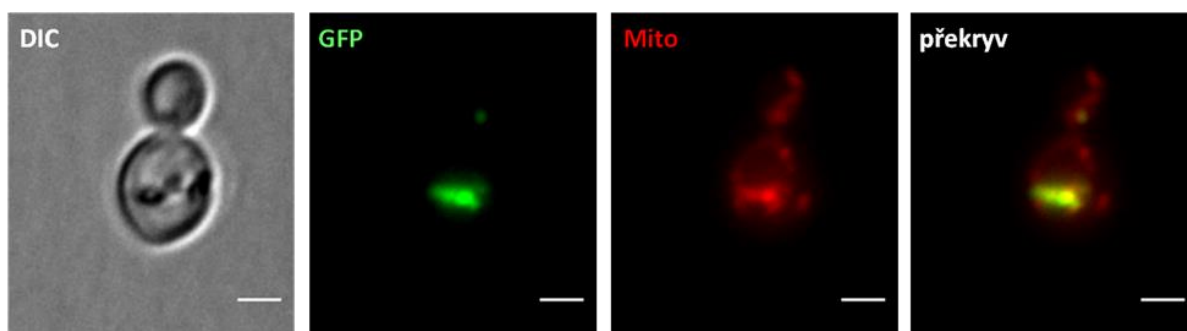
Graf 5: Výsledky β -galaktosidázové aktivity při testovaných interakcích *M249Gsp* obdržené z Institut Pasteur, Paris. Tmavě modrý sloupec představuje negativní kontrolu. Světle modrý sloupec reprezentuje pozitivní kontrolu. Zelený, oranžový a fialový sloupec ukazují slabě pozitivní interakce. Ostatní modré sloupce jsou negativní testované interakce.

5.3.3. Lokalizace *M249GspD*

Sekretin *M. sp. str. 249* (*M249GspD*) nemá na rozdíl od jiných proteinů T2SS (GspE, GspF, GspG) MTS. GspD by měl směřovat do vnější mitochondriální membrány stejně jako jeho bakteriální homolog. Aby byla potvrzena tato hypotéza, byl *M249GspD* exprimován v buňkách *S. cerevisiae*.

Gen *M249GspD* byl nejprve zaklonován do plazmidu pYES2.0 s vloženým GFP genem. Poté byly kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109 transformovány tímto rekombinacním plazmidem, obarveny fluorescenční barvou MitoTracker Red CMXRos značící mitochondrie a pozorovány.

Protein *M249GspD* kolokalizoval s mitochondriemi (Obr. 28). Menší rozšíření *M249GspD* může být způsobeno negativním ovlivněním mitochondriálních funkcí po vložení sekretinu do mitochondriální membrány a celkovým špatným stavem kvasinek po indukci exprese proteinu.



Obrázek 28: Lokalizace *M249GspD*. Zleva: buňka v DIC (diferenční interferenční kontrast), *M249GspD* značený GFP, mitochondrie značené MitoTracker Red CMXRos, překryv; měřítko 2 μ m.

6. Diskuze

Transportní systémy v mitochondrii jsou mozaikou bakteriálních pozůstatků a eukaryotních vynálezů. Doposud však nebylo objeveno, že by mitochondrie měla či potřebovala transportní systém pro export proteinů přes vnější membránu. Objev klíčových genů T2SS u eukaryotických organismů je překvapující, a kdyby byl T2SS schopen obdobné funkce jako v bakteriálních membránách, bylo by zajímavé zjistit, jaké proteiny přenáší. Tzn. jestli a jaké proteiny mitochondrie exportuje. Tuto hypotézu podporuje i objev genů transportních exportních mechanismů (Sec a Tat dráha transportující proteiny přes vnitřní membránu) spolupracujících s T2SS v mtDNA jakobidů (Burger et al., 2013).

6.1. Podjednotky T2SS u *N. gruberi*

V počáteční fázi pokusů s *N. gruberi*, která je v naší laboratoři axenicky kultivována, byly objeveny pouze čtyři klíčové geny T2SS (GspD, GspE, GspF, GspG). Produkty těchto genů byly lokalizovány Mgr. Lenkou Horváthovou, Ph.D. v mitochondriích *N. gruberi* pomocí specifických polyklonálních protilátek (data nepublikována). Po tomto potvrzení, že proteiny směřují do mitochondrie, byly provedeny pokusy možných interakcí pomocí dvou metod: Y2H a BACTH. Obě tyto metody jsou heterologními experimentálními systémy, ke kterým bylo přistoupeno z důvodu absence základních molekulárně-biologických technik u *N. gruberi*. V současné době je v naší a ostatních laboratořích testována řada technik, pomocí kterých by bylo možné *N. gruberi* transformovat.

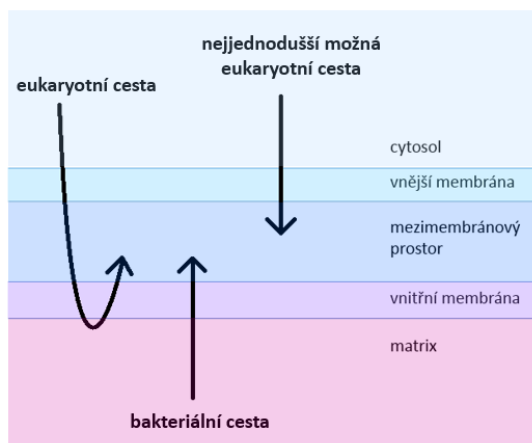
Pomocí Y2H bylo testováno několik dvojic předpokládaných interagujících proteinů. Pozitivní interakce byla detekována pouze u GspD a GspG. Později jsme však zjistili, že byla použita nesprávná délka genu GspD kvůli špatné anotaci genomu. Proto budeme tento experiment opakovat s novým konstruktem. Z hlediska funkce T2SS je tato interakce smysluplná, neboť by se měla uplatňovat během průchodu substrátu (exoproteinu) skrz sekretinový pór díky síle pseudopilu, který pórem také prochází. Vlastní mechanismus sekrece však není plně objasněn ani u bakteriálního T2SS.

Metodu BACTH u proteinů *N. gruberi* provedla Mgr. Lenka Horváthová, Ph.D. Pozitivně vyšla jediná interakce GspG a GspG. Tento výsledek je v souladu s objevem, že podjednotky GspG jsou hlavní pseudopiliny tvořící pseudopilus T2SS (Vignon et al., 2003).

V obou heterologních systémech zvolených ke studiu interakce proteinů vyšel jako interagující protein GspG, proto jsme se rozhodli více se na něj zaměřit. GspG podjednotky

napříč všemi námi studovanými eukaryoty vykazovaly stejnou strukturu obdobnou s prokaryotickými GspG podjednotkami: hydrofóbní úsek, kterým by měly mezi sebou GspG podjednotky interagovat (Köhler et al., 2004) následovaný vlastní pseudopilinovou doménou. Pro studium transportu a maturace GspG byl protein *in vitro* přeložen a importován do izolovaných mitochondrií. Metoda *in vitro* translace nebyla v naší laboratoři dříve aplikována, a proto bylo nečekaným úspěchem množství i správnost přeloženého proteinu pomocí zvoleného PURE express systému. Ten na rozdíl od lyzátu retikulocytů, který je rutinně k těmto pokusům používán, obsahuje pouze purifikované bakteriální ribosomy a potřebné RNA molekuly. Následně bylo provedeno několik importů, které byly postupně optimalizovány. Množství takto připraveného proteinu je dobře viditelné i na SDS-PAGE gelu barveném Coomassie Brilliant Blue. To umožňuje využití pro budoucí *in vitro* pokusy, jako např. *in vitro* skládání pseudopilu. Prodloužený pseudopilus T2SS byl již několikrát pozorován pomocí imunoznačení a následné elektronové mikroskopie (Sauvonnet et al., 2000; Vignon et al., 2003). Další možností je tzv. „piliation assay“, založená na *in vitro* skládání pseudopilu a následné rozdílné sedimentaci monomerů pseudopilinů a polymerních pseudopilinových vláknech. V naší laboratoři byly zatím provedeny importní pokusy. Nejdříve byly proteiny importovány do kvasinkových mitochondrií, na jejichž izolaci je v naší laboratoři zavedený protokol. Importy pozitivní kontroly chimerického proteinu Su9 (podjednotka 9 kvasinkové mitochondriální ATPázy spojená s myší DHFR) i NgGspG do kvasinkových (YPH499) mitochondrií byly úspěšné. Byl prokázán import obou proteinů do mitochondrií a potřeba membránového potenciálu značící import proteinu do vnitřní mitochondriální membrány (Martin et al., 1991). U pozitivní kontroly Su9 je znatelný posun importovaného proteinu značící procesování kvasinkovou mitochondriální procesující peptidázou. Na rozdíl od importu NgGspG, kde žádný posun vidět není. Kvasinková mitochondriální procesující peptidáza zřejmě nerozpozná štěpící místo u NgGspG. Dále byla provedena izolace mitochondrií *N. gruberi* a následně import NgGspG. Tento import již nebyl tak úspěšný. Je na něm vidět mnoho bandů, u kterých se můžeme dohadovat o procesování NgGspG, ale import tu není tak znatelný jako u kvasinkových mitochondrií. Důvodem bude zřejmě špatný stav mitochondrií, na jejichž izolaci není ustálený osvědčený protokol. Nejrizikovějším bodem izolace mitochondrií *N. gruberi* je očividně homogenizace buněk. V našem protokolu je homogenizace prováděna sonikací. Možností rozbití membrán je ale více, např.: homogenizace pomocí pístového Dounceova homogenizátoru (používáno k narušení membrán kvasinek, které jsou díky buněčné stěně odolnější), cykly mražení a tání nebo lyze detergentem, která se používá k narušení membrán trypanosom pomocí nízké koncentrace digitoninu (Vercesi et al., 1991).

Studium importu GspG je zajímavé z důvodu biogeneze pseudopilu a vlastní sekrece subrátů T2SS. Přesto, že je funkce GspG vázaná na mezimembránový prostor – nutnost membránového potenciálu pro import proteinu (i když v heterologním systému kvasinkové mitochondrie), naznačuje jeho import do mitochondriální matrix. Jako jednodušší řešení se jeví přímý import pouze přes vnější membránu (Obr. 29). Topologie importu byla ale zřejmě v rámci evoluce shodná s bakteriálním systémem, tj. export podjednotek pseudopilinu z cytoplasmy/mitochondriální matrix (Francetic et al., 2007).



Obrázek 29: Způsoby importu GspG do mezimembránového prostoru. Nejjednodušší možná eukaryotní cesta se zřejmě neuplatňuje.

Podobný příklad můžeme vidět i jinde v mitochondriální membráně. SAM komplex, translokon pomáhající složení β -barelovým proteinům vnější mitochondriální membrány, má stále stejnou topologii importu jako jeho bakteriální homolog BAM komplex. Proteiny se do SAM komplexu dostávají z mezimembránového prostoru, i když jednodušší by bylo vkládání těchto proteinů do vnější mitochondriální membrány přímo z cytosolu (Chacinska et al., 2009).

6.2. Podjednotky T2SS u *M. sp. str. 249*

Alignmenty T2SS proteinů ukázaly, že aminokyselinové sekvence *N. gruberi* jsou velmi divergentní a MTS příliš dlouhé. Navíc publikovaný genom *N. gruberi* obsahuje řadu chybějících úseků. Proto jsme se rozhodli, že ačkoli máme možnost axenicky kultivovat pouze *N. gruberi*, budeme dále pokračovat ve studiu těchto genů i u rodu *Malawimonas*. Genové sekvence T2SS u druhu *M. sp. str. 249* jsou kvalitnější než u *N. gruberi*. Gsp proteiny *M. sp. str. 249* mají kratší MTS a také vyšší podobnost s bakteriálními Gsp proteiny.

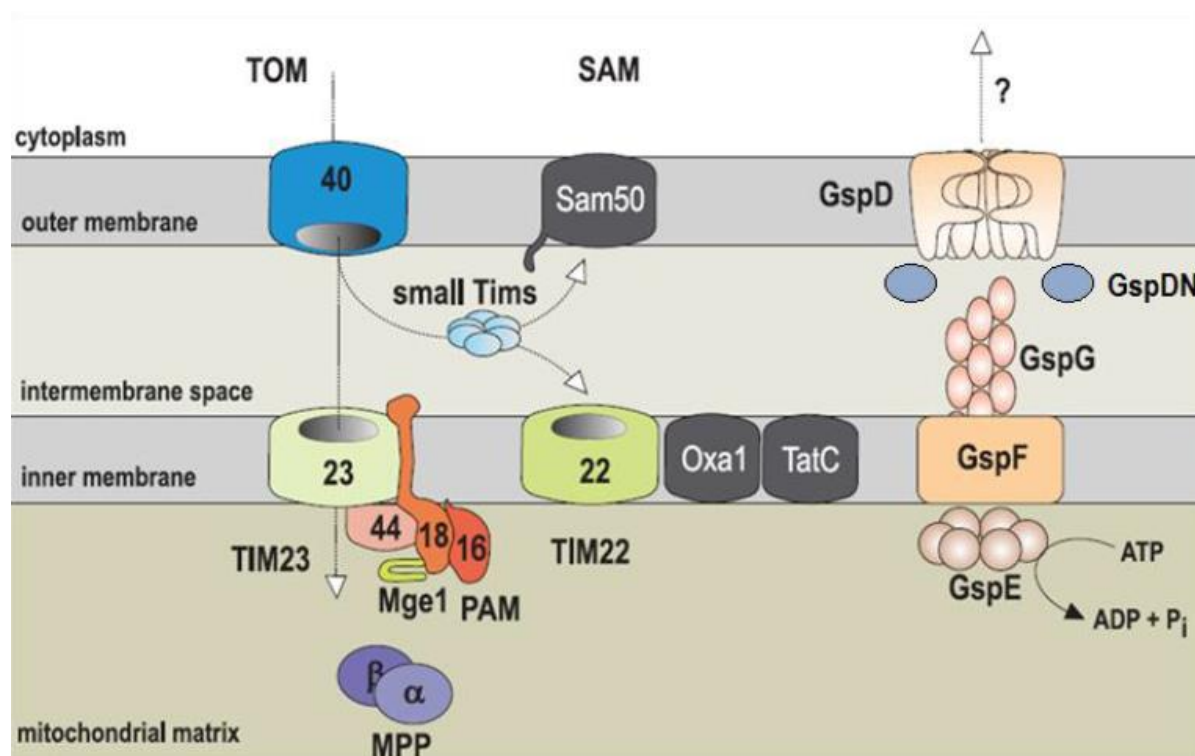
Toto rozhodnutí znamenalo mj. i to, že studium proteinů bude probíhat využitím heterologních biologických systémů. V této době už byly objeveny všechny současné podjednotky eukaryotického T2SS (GspD, GspND, GspE1-E4, GspF, GspG1-2, potenciální substrát GspZ), proto jsou pokusy u *M. sp.* str. 249 obsáhlejší než u *N. gruberi*. Do experimentů ke zjištění interakcí byly zahrnuty tyto proteiny: GspD, GspND, GspE, GspF, GspG1, GspG2, GspZ.

I u těchto proteinů bylo jejich vzájemné působení zjišťováno pomocí metod Y2H a BACTH. Nejprve byly provedeny Y2H pokusy. V nich byla jasně potvrzena interakce mezi GspD a GspD, což je v souladu se strukturou bakteriálního GspD, který tvoří symetrický sekretinový pór v membráně složený z několika podjednotek (Nouwen et al., 1999). Dále byla detekována slabá interakce mezi GspND a GspD. I toto vzájemné působení je logické a odpovídá bakteriálnímu uspořádání T2SS. Eukaryotický GspD je rozdělen na dva proteiny: N-terminální mezimembránovou část a C-terminální transmembránovou část. Obě části sekretinu by měly zaujímat stejnou strukturu a funkci jako u prokaryot, která je dobře popsána u sekretinového póru *Vibrio cholerae* (Reichow et al., 2010), a tím pádem spolu interagovat. Zajímavá je detekce slabé interakce mezi GspND a potenciálním substrátem GspZ. Pokud by GspZ byl skutečně substrátem pro mitochondriální T2SS, s N-terminální doménou GspD (GspND) by mohl při exportu opravdu interagovat (Korotkov et al., 2010).

Poté byly provedeny BACTH pokusy, avšak v naší laboratoři nebyla mimo pozitivní kontroly prokázána žádná interakce. Pozitivní kontroly sice byly detekovány, ale s daleko menší intenzitou než je u BACTH metody obvyklé, tzn. že i případné špatně detekovatelné slabé interakce mohly zaniknout. Připravené konstrukty byly poslány do laboratoře našich spolupracovníků (dr. Olivera Francetic, Institut Pasteur), kde mají s BACTH metodou zkušenosti a v současnosti se pracuje na reanalýze dat. Průběžné výsledky ukazují interakci mezi GspG1 a GspG1, což je jediná dosud detekovaná interakce shodná s proteiny *N. gruberi*, značící formování pseudopilu (Vignon et al., 2003). Dále byla detekována interakce mezi GspE a GspE. Bakteriální sekreční ATPáza GspE pravděpodobně vytváří hexamer (Lu et al., 2013), takže i tato interakce má své opodstatnění. Poté byla detekována ještě interakce mezi GspG2 a GspF. Tato interakce nebyla v bakteriálním T2SS identifikována. Vysvětlením by mohlo být, že GspF je jediným proteinem vnitřní membrány u eukarot, mohl by tedy zastávat i funkce, které v bakteriálním T2SS patří jiným proteinům. Eukaryotický GspF by tak mohl fungovat jako GspL, spojka, která převádí konformační změny mezi sekreční ATPázou GspE a pseudopilem (Gray et al., 2011), jehož hlavní podjednotky jsou pseudopiliny GspG. Za takového předpokladu by spojení mezi GspF a GspG bylo logické.

V Y2H a BACTH experimentech byly obdrženy jiné výsledky, které se vzájemně doplňují a utvářejí obraz, jak by spolu mohly eukaryotické podjednotky T2SS interagovat. Žádná interakce nikdy nevyšla oběma směry, tzn. stejné geny zaklonované do opačných vektorů, i když byly vždy testovány. Tento jev se stává poměrně často. Může být způsoben rozdílným skládáním fúzních proteinů i negativním efektem studovaných proteinů na funkci reportérového transkripčního faktoru. Je třeba pamatovat, že obě tyto metody jsou heterologními biologickými systémy a proteiny v buňkách eukaryotických organismů mohou fungovat odlišně. Např. interakce mezi GspD proteiny nikdy nevyšla za využití BACTH metody. To by mohlo být způsobeno tím, že sekretinový pór v bakteriální membráně může být mnohem toxičtější, než pokud se vytvoří v již semipermeabilní mitochondriální membráně. Avšak souhrn všech obdržených interakcí naznačuje, že T2SS by skutečně mohl tvořit komplex podobný tomu v bakteriálních membránách.

Naše genomické analýzy ukázaly, že v mitochondriálních membránách zástupců *Discoba* a *Malawimonada* se vyskytují „klasické“ TIM, TOM a SAM komplexy pro import proteinů do mitochondrie. T2SS tak nezastupuje úlohu importní mašinerie a mohl by s importem koexistovat nezávisle ve své původní exportní funkci (Obr. 30).



Obrázek 30: Představa mitochondriální membrány zástupců *Discoba* a *Malawimonada*. V mitochondriálních membránách těchto organismů se nachází kompletní importní mašinerie, kterou představuje řada proteinů: TOM komplex (Tom40), TIM23 komplex s PAM (Tim23, 44, 18, 16; Mge1), mitochondriální procesující peptidáza (MPP) a TIM 22 komplex (Tim22). Komponenty vyznačené v černé barvě (Sam50, Oxa1, TatC) mají jasné bakteriální homology. V pravé části obrázku ukázány klíčové podjednotky T2SS (GspD, ND, E, F, G).

6.3. T2SS v mitochondriích

Další zajímavou neznámou v tomto projektu je potenciální substrát GspZ. Z alignmentu je patrné množství konzervovaných cysteinů a histidinů, což značí, že by se mohlo jednat o hemový nebo FeS protein. Právě tyto proteiny jsou častými substráty T2SS jako je tomu např. u bakterie *Geobacter*, která exportuje pomocí T2SS cytochrom účastníci se extracelulárního elektrontransportního řetězce (Leang et al., 2010).

Eukaryotické geny T2SS jsou pravděpodobně monofyletické, z čehož zřejmě vyplývá, že eukaryotický T2SS pochází z mitochondriálního předka. To by znamenalo, že původní mitochondrie byla schopna sekretovat proteiny do svého hostitele a bylo by tak velmi zajímavé identifikovat substrát, který by pomohl objasnit vztah původního endosymbionta a hostitele. Tyto zjištění by tak mohly vést k objasnění příčiny vlastní endosymbiózy, která vedla ke vzniku mitochondrie. Za úvahu stojí i myšlenka, že mitochondrie naprosté většiny eukaryot, které T2SS nemají, jsou schopny sekrece proteinů, byť pomocí jiného a dosud neznámého mechanismu.

7. Závěr

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o bakteriálním T2SS, krátce se zabývá importem proteinů do mitochondrií a popisuje prvky, u kterých byly nalezeny klíčové podjednotky T2SS. Experimentální část je pak zaměřena právě na podjednotky T2SS u *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249, kam patří sekretinový pór vnější membrány GspD, protein vnitřní membrány GspF, sekreční ATPáza GspE a hlavní pseudopilin GspG tvořící pseudopilus. Dále byla nalezena podjednotka GspND a potenciální substrát T2SS GspZ. Pomocí dvouhybridního kvasinkového a bakteriálního systému se podařilo potvrdit četné interakce naznačující stejnou architekturu T2SS u protist jako u bakterií. Dále jsme *in vitro* přeložili NgGspG a studovali jeho import do izolovaných mitochondrií *S. cerevisiae* a *N. gruberi*. Také jsme zkoumali import M249GspD do mitochondrie *S. cerevisiae*. Na závěr je diskutován biologický a evoluční význam tohoto objevu.

8. Seznam často používaných zkratk

| | |
|---------------|--|
| BACTH | bakteriální dvouhybridní systém („bacterial two-hybrid“) |
| BAM | „ β -barrel assembly machinery“ |
| DHFR | dihydrofolát reduktáza |
| Gsp | „general secretory pathway“ |
| GspC | spojka vnitřní a vnější membrány T2SS |
| GspD | sekretin T2SS |
| GspE | sekreční ATPáza T2SS |
| GspF, M, L | proteiny vnitřní membrány T2SS |
| GspG | hlavní pseudopilin T2SS |
| GspH, I, J, K | minoritní pseudopiliny T2SS |
| GspND | N-terminální doména sekretinu T2SS |
| GspZ | potenciální substrát T2SS |
| mtDNA | mitochondriální DNA |
| MTS | mitochondriální presekvence ("mitochondrial targeting sequence") |
| M249Gsp | Gsp protein <i>Malawimonas sp.</i> str. 249 |
| NgGsp | Gsp protein <i>Naegleria gruberi</i> |
| PAM | „presequence translocase-associated motor“ |
| SAM | „sorting and assembly machinery“ |
| SRP | „signal recognition particle“ |
| T2SS | sekreční systém typu II („type II secretion system“) |
| T3SS | sekreční systém typu III („type III secretion system“) |
| T4PS | pilusový systém typu IV („type IV pilus system“) |
| TIM | „translocase of the inner membrane“ |
| TMD | transmembránová doména („transmembrane domain“) |
| TOM | „translocase of the outer membrane“ |
| Y2H | kvasinkový dvouhybridní systém („yeast two-hybrid“) |

9. Seznam použité literatury

- Abendroth, J., Rice, A.E., McLuskey, K., Bagdasarian, M., and Hol, W.G.J. (2004). The crystal structure of the periplasmic domain of the type II secretion system protein EpsM from *Vibrio cholerae*: the simplest version of the ferredoxin fold. *J. Mol. Biol.* 338, 585–596.
- Abendroth, J., Murphy, P., Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Hol, W.G.J. (2005). The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 348, 845–855.
- Abendroth, J., Mitchell, D.D., Korotkov, K. V., Johnson, T.L., Kreger, A., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2009). The three-dimensional structure of the cytoplasmic domains of EpsF from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. *J. Struct. Biol.* 166, 303–315.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., and Nussberger, S. (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* 153, 1151–1160.
- Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F.B., Kirkness, C.M., Lee, W.R., and Seal, D. V. (1996). Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology* 103, 485–494.
- Battesti, A., and Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* 58, 325–334.
- van den Berg, B., Clemons Jr, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2003). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36–44.
- Berks, B.C. (2015). The twin-arginine protein translocation pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 843–864.
- Bihlmaier, K., Mesecke, N., Terziyska, N., Bien, M., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J. Cell Biol.* 179, 389–395.
- Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A. (1998). The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family). *Mol. Microbiol.* 27, 31–40.
- Brown, S., and De Jonckheere, J.F. (1999). A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSUrDNA sequences. *Eur. J. Protistol.* 35, 49–54.
- Burger, G., Gray, M.W., Forget, L., and Lang, B.F. (2013). Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol. Evol.* 5, 418–438.
- Camberg, J.L., and Sandkvist, M. (2005). Molecular analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretion ATPase EpsE molecular analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretion ATPase EpsE. *J. Bacteriol.* 187, 249–256.

- Camberg, J.L., Johnson, T.L., Patrick, M., Abendroth, J., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2007). Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *EMBO J.* *26*, 19–27.
- Carter, R.F. (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* *100*, 217–244.
- Cerva, L., and Novak, K. (1968). Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. *Science* *160*, 92.
- Cline, K., and Mori, H. (2001). Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.* *154*, 719–729.
- Collin, S., Guilvout, I., Chami, M., and Pugsley, A.P. (2007). YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD. *Mol. Microbiol.* *64*, 1350–1357.
- Collin, S., Guilvout, I., Nickerson, N.N., and Pugsley, A.P. (2011). Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin. *Mol. Microbiol.* *80*, 655–665.
- Collins, R.F., Frye, S.A., Kitmitto, A., Ford, R.C., Tønjum, T., and Derrick, J.P. (2004). Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. *J. Biol. Chem.* *279*, 39750–39756.
- Cope, J.R., Ratard, R.C., Hill, V.R., Sokol, T., Causey, J.J., Yoder, J.S., Mirani, G., Mull, B., Mukerjee, K.A., Narayanan, J., et al. (2015). The first association of a primary amebic meningoencephalitis death with culturable *Naegleria fowleri* in tap water from a US treated public drinking water system. *Clin. Infect. Dis.* *60*, e36–e42.
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 343–359.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W., and Koehler, C.M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* *21*.
- D’Enfert, C., Ryter, A., and Pugsley, A.P. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J.* *6*, 3531–3538.
- Derelle, R., and Lang, B.F. (2012). Rooting the eukaryotic tree with mitochondrial and bacterial proteins. *Mol. Biol. Evol.* *29*, 1277–1289.
- Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2009). The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. *J. Biol. Chem.* *284*, 34580–34589.

- Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2011). Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J. Biol. Chem.* *286*, 40792–40801.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245–246.
- Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C.A., and Pugsley, A.P. (2007). Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG pseudopilin component of a type II secretion system. *J. Bacteriol.* *189*, 1783–1793.
- Fulton, C., Webster, C., and Wu, J.S. (1984). Chemically defined media for cultivation of *Naegleria gruberi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *81*, 2406–2410.
- Genin, S., and Boucher, C.A. (1994). A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol. Gen. Genet.* *243*, 112–118.
- Gérard-Vincent, M., Robert, V., Ball, G., Bleves, S., Michel, G.P.F., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002). Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus. *Mol. Microbiol.* *44*, 1651–1665.
- Gray, M.D., Bagdasarian, M., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2011). In vivo cross-linking of EpsG to EpsL suggests a role for EpsL as an ATPase-pseudopilin coupling protein in the type II secretion system of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* *79*, 786–798.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 3859–3864.
- Hardie, K.R., Lory, S., and Pugsley, A.P. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* *15*, 978–988.
- Hirst, T.R., and Holmgren, J. (1987). Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 7418–7422.
- Hodgkinson, J.L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P.C.A., Morris, E.P., Wall, J.S., Lea, S.M., and Blocker, A.J. (2009). Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 477–485.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* *23*, 3735–3746.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.

- De Jonckheere, J.F., and Brown, S. (2005). The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist* 156, 89–96.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5752–5756.
- Köhler, R., Schäfer, K., Müller, S., Vignon, G., Diederichs, K., Philippsen, A., Ringler, P., Pugsley, A.P., Engel, A., and Welte, W. (2004). Structure and assembly of the pseudopilin PulG. *Mol. Microbiol.* 54, 647–664.
- Korotkov, K. V., and Hol, W.G.J. (2008). Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 462–468.
- Korotkov, K., Pardon, E., Steyaert, J., and Hol, W.G. (2010). Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure* 17, 255–265.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 336–351.
- Korotkov, K. V., Gray, M.D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2009). Calcium is essential for the major pseudopilin in the type 2 secretion system. *J. Biol. Chem.* 284, 25466–25470.
- Korotkov, K. V., Gonen, T., and Hol, W.G.J. (2011a). Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem. Sci.* 36, 433–443.
- Korotkov, K. V., Johnson, T.L., Jobling, M.G., Pruneda, J., Pardon, E., Héroux, A., Turley, S., Steyaert, J., Holmes, R.K., Sandkvist, M., et al. (2011b). Structural and functional studies on the interaction of GspC and GspD in the type II secretion system. *PLoS Pathog.* 7.
- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Müller, H., Jensen, R.E., Wagner, R., and Pfanner, N. (2002). Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol. Cell* 9, 363–373.
- Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., et al. (2008). Dissecting membrane insertion of mitochondrial β -barrel proteins. *Cell* 132, 1011–1024.
- Lang, B.F., Burger, G., O’Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., and Gray, M.W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493–497.
- Leang, C., Qian, X., Mester, T., and Lovley, D.R. (2010). Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4080–4084.

- Lu, C., Turley, S., Marionni, S.T., Park, Y.J., Lee, K.K., Patrick, M., Shah, R., Sandkvist, M., Bush, M.F., and Hol, W.G.J. (2013). Hexamers of the type II secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with increased ATPase activity. *Structure* 21, 1707–1717.
- Lüke, I., Handford, J.I., Palmer, T., and Sargent, F. (2009). Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch. Microbiol.* 191, 919–925.
- Lybarger, S.R., Johnson, T.L., Gray, M.D., Sikora, A.E., and Sandkvist, M. (2009). Docking and assembly of the type II secretion complex of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 191, 3149–3161.
- Martin, J., Mahlke, K., and Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import: $\Delta\Psi$ drives the movement of presequences. *J. Biol. Chem.* 266, 18051–18057.
- McLaughlin, L.S., Haft, R.J.F., and Forest, K.T. (2012). Structural insights into the type II secretion nanomachine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 208–216.
- Van der Meeren, R., Wen, Y., Van Gelder, P., Tommassen, J., Devreese, B., and Savvides, S.N. (2013). New insights into the assembly of bacterial secretins: structural studies of the periplasmic domain of XcpQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 288, 1214–1225.
- Milenkovic, D., Gabriel, K., Guiard, B., Schulze-Specking, A., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2007). Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J. Biol. Chem.* 282, 22472–22480.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Popov-Čeleketić, D., Mapa, K., Gevorgyan-Airapetov, L., Zohary, K., Hell, K., Azem, A., and Neupert, W. (2009). Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 20, 1400–1407.
- Mori, H., and Cline, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid ΔpH /Tat translocase. *J. Cell Biol.* 157, 205–210.
- Nivaskumar, M., and Francetic, O. (2014). Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 1568–1577.
- Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A., and Pugsley, A.P. (1999). Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8173–8177.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991). Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene PilD is a prepilin leader peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3281–3285.
- O’Kelly, C.J. (1993). The Jakobid flagellates: structural features of *Jakoba*, *Reclinomonas* and *Histiona* and implications for the early diversification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 627–636.

- O'Kelly, C.J., and Nerad, T.A. (1999). *Malawimonas jakobiformis* n. gen., n. sp. (Malawimonadidae n. fam.): a *Jakoba*-like heterotrophic nanoflagellate with discoidal mitochondrial cristae. *J. Eukaryot. Microbiol.* *46*, 522–531.
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M.N., Russel, M., and Darst, S.A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* *325*, 461–470.
- Paetzel, M., Dalbey, R.E., and Strynadka, N.C.. (2000). The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. *Pharmacol. Ther.* *87*, 27–49.
- Papanikou, E., Karamanou, S., and Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 839–851.
- Phizicky, E.M., and Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* *59*, 94–123.
- Possot, O., and Pugsley, A.P. (1994). Molecular characterization of PulE, a protein required for pullulanase secretion. *Mol. Microbiol.* *12*, 287–299.
- Possot, O.M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F., and Pugsley, A.P. (2000). Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J. Bacteriol.* *182*, 2142–2152.
- Preuss, M., Ott, M., Funes, S., Lührink, J., and Herrmann, J.M. (2005). Evolution of mitochondrial Oxa proteins from bacterial YidC: inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J. Biol. Chem.* *280*, 13004–13011.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001). An inner membrane platform in the type II secretion machinery of gram-negative bacteria. *EMBO Rep.* *2*, 244–248.
- Reichow, S.L., Korotkov, K. V, Hol, W.G.J., and Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1226–1232.
- Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* *40*, 271–283.
- Satyshur, K.A., Worzalla, G.A., Meyer, L.S., Heiniger, E.K., Aukema, K.G., Misic, A.M., and Forest, K.T. (2007). Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure* *15*, 363–376.
- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A.P., and Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *19*, 2221–2228.
- Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.U., and Wickner, W. (1991). $\Delta\mu\text{H}^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* *64*, 927–939.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 13207–13212.

- Strom, M.S., Nunn, D.N., and Lory, S. (1993). A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2404–2408.
- Sysoeva, T.A., Zepeda-Rivera, M.A., Huppert, L.A., and Burton, B.M. (2014). Dimer recognition and secretion by the ESX secretion system in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 201322200.
- Tokuda, H. (2009). Biogenesis of outer membranes in gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 465–473.
- Tosi, T., Nickerson, N.N., Mollica, L., Jensen, M.R., Blackledge, M., Baron, B., England, P., Pugsley, A.P., and Dessen, A. (2011). Pilotin-secretin recognition in the type II secretion system of *Klebsiella oxytoca*. *Mol. Microbiol.* 82, 1422–1432.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9.
- Vercesi, A.E., Bernardes, C.F., Hoffmann, M.E., Gadelha, F.R., and Docampo, R. (1991). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* 266, 14431–14434.
- Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G.P.F., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2009). HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J. Biol. Chem.* 284, 33815–33823.
- Vignon, G., Köhler, R., Larquet, E., Giroux, S., Prévost, M.-C., Roux, P., and Pugsley, A.P. (2003). Type IV-like pili formed by the type II secretin: specificity, composition, bundling, polar localization, and surface presentation of peptides. *J. Bacteriol.* 185, 3416–3428.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.-F., and Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20, 6735–6741.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299, 262–265.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfish, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424, 5–10.
- Yamagata, A., and Tainer, J.A. (2007). Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism. *EMBO Journal* 26, 878–890.
- Yanez, M.E., Korotkov, K. V., Abendroth, J., and Hol, W.G.J. (2008a). Structure of the minor pseudopilin EpsH from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 377, 91–103.

Yanez, M.E., Korotkov, K. V., Abendroth, J., and Hol, W.G.J. (2008b). The crystal structure of a binary complex of two pseudopilins: EpsI and EpsJ from the type 2 secretion system of *Vibrio vulnificus*. J. Mol. Biol. 375, 471–486.